

**Struktur-basiertes Protein Engineering
von neuen Penicillin G Acylasen
aus Gram-positiven Bakterien
für innovative biotechnologische Anwendungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Janine Mayer
aus Seesen

1. Referent:

Professor Dr. Dieter Jahn

2. Referentin:

Professorin Dr. Anett Schallmey

eingereicht am:

09.12.2020

mündliche Prüfung (Disputation) am:

29.01.2021

Druckjahr 2021

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Mayer, J., Pippel, J., Günther, G., Müller, C., Lauermann, A., Knuuti, T., Blankenfeldt, W., Jahn, D., Biedendieck, R. Crystal structures and protein engineering of three different penicillin G acylases from Gram-positive bacteria with different thermostability, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103: 7537-7552 (2019).

Tagungsbeiträge:

Mayer, J., Knuuti, T., Baumgarten, L., Bischoff, L., Biedendieck, R. Construction of a signal peptide library to improve recombinant protein secretion in *Bacillus megaterium* (Poster), 6th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Leipzig (2020)

Mayer, J., Solarczek, J., Kubiak, M., Biedendieck, R., Schallmey, A., Schilde, C. Correlation of structure and properties of protein crystals in consideration of downstream processing and formulation (Vortrag), SPP 1934 DiSPBiotech Statuskolloquium, Braunschweig (2019).

Mayer, J., Günther, G., Pippel, J., Müller, C., Kubiak, M., Knuuti, T., Schilde, C., Blankenfeldt, W., Biedendieck, R. Novel penicillin G acylases from Gram-positive bacteria with increased thermostability and mechanical properties (Poster), Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Mainz (2019).

Mayer, J., Pippel, J., Günther, G., Müller, C., Knuuti, T., Blankenfeldt, W., Jahn, D., Biedendieck, R. Crystal structures and protein engineering of three different penicillin G acylases from Gram-positive bacteria with different thermostability (Poster), 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BioTrans 2019), Groningen (2019).

Mayer, J., Pippel, J., Günther, G., Müller, C., Knuuti, T., Blankenfeldt, W., Jahn, D., Biedendieck, R. Crystal structures and protein engineering of three different penicillin G acylases from Gram-positive bacteria with different thermostability (Poster), 2nd International *EUROMBR Training Course*, Braunschweig (2019).

Mayer, J., Solarczek, J., Kubiak, M., Biedendieck, R., Schallmey, A., Schilde, C. Correlation of structure and properties of protein particles in consideration of downstream processing and formulation (Vortrag), SPP 1934 DiSPBiotech Statuskolloquium, Bremen (2018).

Mayer, J., Günther, G., Pippel, J., Kubiak, M., Lauermann, A., Schilde, C., Blankenfeldt, W., Biedendieck, R. Crystal structures and characterization of different thermostable Penicillin G acylases from Gram-positive bacteria (Poster), ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2018).

Kubiak, M., Solarczek, J., Mayer, J., Kampen, I., Biedendieck, R., Schallmey, A., Schilde, C. Struktur-Eigenschaftsbeziehung bei der Aufarbeitung und Formulierung von Proteinpartikeln (Vortrag), ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2018).

Mayer, J., Günther, G., Pippel, J., Lauermann, A., Blankenfeldt, W., Biedendieck, R. Crystal structures of different thermostable penicillin G acylases (PGAs) from Gram-positive organisms (Poster), Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg (2018).

Mayer, J., Solarczek, J., Kubiak, M., Biedendieck, R., Schallmey, A., Schilde, C. Correlation of structure and properties of protein particles in consideration of downstream processing and formulation (Vortrag), SPP 1934 DiSPBiotech Statuskolloquium, Braunschweig (2017)

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	1
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Biotechnologie und Biokatalyse	9
1.2 Biopharmazeutika und β -Lactam-Antibiotika	9
1.3 Penicillin G Acylase	10
1.3.1 Entdeckung und industrielle Anwendung der Penicillin G Acylase	10
1.3.2 Vorkommen, Struktur und Reaktion von PGAs	12
1.4 Protein Engineering	14
1.4.1 Rationales Proteindesign und gerichtete Enzymevolution	15
1.4.2 Protein Engineering von Penicillin G Acylasen	16
1.5 Immobilisierung von Enzymen	17
1.5.1 Quervernetzte Enzymkristalle zur Anwendung als immobilisierte Biokatalysatoren	18
1.5.2 Herstellung von quervernetzten Enzymkristallen	20
1.5.3 Mechanische Eigenschaften von quervernetzten Enzymkristallen	22
1.6 Proteinsekretion in <i>Bacillus</i> species	22
1.6.1 Secretion (Sec)-Pathway	24
1.6.2 Signalpeptide	25
1.7 <i>Bacillus megaterium</i>	26
1.7.1 Allgemeines	26
1.7.2 Signalpeptid-Bibliothek in <i>Bacillus megaterium</i>	27
2 Zielsetzung	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme, Kits und Materialien	30
3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	32
3.3 Plasmidkonstruktion	40
3.4 Kulturmedien und Zusätze	42
3.5 Mikrobiologische Techniken	42
3.5.1 Sterilisation	42
3.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	42

3.6 Molekularbiologische Techniken.....	43
3.6.1 Herstellung und Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>Escherichia coli</i> DH10B Zellen	43
3.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	43
3.6.3 Herstellung und Transformation von <i>Bacillus megaterium</i> MS941 Protoplasten	44
3.6.4 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Bacillus megaterium</i>	45
3.6.5 Herstellung und Transformation von <i>Bacillus subtilis</i>	46
3.6.6 Quantifizierung von DNA.....	47
3.6.7 Polymerase-Kettenreaktion	47
3.6.8 Kolonie-PCR	47
3.6.9 Positionsspezifische Mutagenese mit der QuikChange™ Methode.....	48
3.6.10 Reinigung von PCR-Fragmenten.....	49
3.6.11 Restriktionsverdau	49
3.6.12 Dephosphorylierung von Oligonukleotiden	49
3.6.13 Agarosegelelektrophorese	49
3.6.14 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion.....	50
3.6.15 Ligation	50
3.6.16 DNA-Sequenzierung	50
3.7 Rekombinante Proteinproduktion und -reinigung in <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.7.1 Proteinproduktion im Mikrobioreaktor, Schüttelkolben und Rührkesselreaktor.....	50
3.7.2 Proteinreinigung durch Ionenaustauschchromatographie	52
3.7.3 Proteinreinigung durch präparative Gelpermeationschromatographie	53
3.7.4 Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen.....	53
3.8 Biochemische Charakterisierung.....	53
3.8.1 Analyse der extrazellulären Proteine durch Ammoniumsulfatfällung.....	53
3.8.2 Analyse löslicher und unlöslicher, intrazellulärer Proteine aus <i>Bacillus megaterium</i>	54
3.8.3 SDS-PAGE.....	54
3.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	55
3.8.5 NIPAB-Assay zur Bestimmung der PGA-Aktivität	55
3.8.6 Thermal Shift Assay	56
3.8.7 N-terminale Protein-Sequenzierung	56
3.8.8 Bestimmung von PGA-Aktivität und Substratspektrum mittels HPLC	57

3.9 Proteinkristallisation und Quervernetzung	58
3.9.1 Dampfdiffusionskristallisation im Sitting Drop-Verfahren	58
3.9.2 Dampfdiffusionskristallisation im Hanging Drop-Verfahren	58
3.9.3 Fällungskristallisation	59
3.9.4 Herstellung und Einsatz von Kristall-Seeds	59
3.9.5 Quervernetzung.....	59
3.10 Messung von Kristallen und CLECs	59
3.10.1 Strukturaufklärung – Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung	59
3.10.2 Mechanische Messung von CLECs durch Nanoindentation	60
4 Ergebnisse und Diskussion	61
4.1 Identifikation und Produktion neuartiger Penicillin G Acylasen	61
4.2 Reinigung und Charakterisierung der neuartigen Penicillin G Acylasen	65
4.3 Kristallstrukturen der PGAs aus <i>Bacillus</i> species FJAT-27231, <i>Bacillus thermotolerans</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	73
4.4 Untersuchung des Substratspektrums der PGAs aus <i>Bacillus</i> species	81
4.5 Untersuchung von quervernetzten Penicillin G Acylase-Kristallen (PGA-CLECs)	87
4.5.1 Kristalloptimierung und Herstellung von PGA-CLECs	87
4.5.2 Mechanische Messungen von PGA-CLECs durch AFM-basierte Nanoindentation	89
4.5.3 Aktivität von PGA-CLECs	94
4.6 Konstruktion und Eigenschaften von Hybrid- und Single-chain PGAs	96
4.6.1 Erstellung und Charakterisierung von Hybrid-PGAs.....	96
4.6.2 Erstellung und Charakterisierung von Single-chain PGAs	100
4.7 Protein Engineering zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA durch Verringerung der Oberflächenentropie.....	107
4.8 Untersuchungen zur Verbesserung der Sekretion von Penicillin G Acylasen	117
4.8.1 Sekretion von Penicillin G Acylase mit <i>B. megaterium</i> und <i>B. subtilis</i> über verschiedene Signalpeptide aus <i>Bacillus</i> species.....	117
4.8.2 Untersuchung der Sekretion der FJAT-PGA nach Sättigungsmutagenese im Signalpeptid	120
4.8.3 Verbesserung der PGA-Sekretion durch Screening einer Signalpeptid-Bibliothek	123
5 Zusammenfassung.....	135
6 Ausblick.....	136
7 Literaturverzeichnis	137

Inhaltsverzeichnis

8 Anhang.....	146
Danksagung	150

Abkürzungsverzeichnis

6-APA	6-Aminopenicillansäure
7-ACA	7-Aminocephalosporansäure
7-ADCA	7-Amino-desacetoxy-cephalosporansäure
ACN	Acetonitril
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. Atomic Force Microscope)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BmasPGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus massiliogorillae</i>
BmPGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945
BnPGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus niacini</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. Bovine Serum Albumin)
BtPGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus thermotolerans</i>
c	Konzentration
Carb	Carbenicillin
CLEC	Quervernetzter Enzymkristall (Cross-Linked Enzyme Crystal)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DO	Gelöstsauerstoff-Konzentration (engl. Dissolved Oxygen)
EA	Enzymaktivität, volumetrisch [U/mL] oder spezifisch [U/mg]
EcPGA	Penicillin G Acylase aus <i>Escherichia coli</i> ATCC11105
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FJAT-PGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus sp.</i> FJAT-27231
FPLC	Schnelle Proteinflüssigchromatographie (engl. Fast Protein Liquid Chromatography)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HP	Hybrid Penicillin G Acylase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
kDa	Kilodalton
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. Multiple Cloning Site)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
M _r	Relative Molekülmasse
NABA	2-Nitro-5-aminobenzoessäure
NaPh	Natriumphosphat
NIPAB	6-Nitro-3-(phenylacetamido)benzoessäure
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm

<i>ori</i>	Replikationsursprung (engl. Origin of Replication)
PAA	Phenyllessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Penicillin G Acylase
pI	Isoelektrischer Punkt
pMSP	Multisignalpeptidplasmid
RFU	Relative Fluoreszenz-Einheit (engl. Relative Fluorescence Unit)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SC-PGA	Single-chain Penicillin G Acylase
SER	Reduktion der Oberflächenentropie (engl. Surface Entropy Reduction)
S/H-Verhältnis	Synthese-zu-Hydrolyse-Verhältnis
SP	Signalpeptid
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
üN	Über Nacht
UNC-PGA	Penicillin G Acylase aus <i>Bacillus</i> sp. UNC438CL73TsuS30
v/v	Volumenanteil pro Volumen (engl. Volume per Volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (engl. Weight per Volume)

1 Einleitung

1.1 Biotechnologie und Biokatalyse

Bereits seit Jahrtausenden werden Mikroorganismen und deren Enzyme in der Brot- und Käseherstellung, beim Bierbrauen und in der Weinherstellung verwendet, lange bevor die Existenz dieser überhaupt entdeckt wurde (Sheldon and Pereira 2017). Heute werden lebende Zellen oder gereinigte Enzyme als Biokatalysatoren eingesetzt, um Lebens- und Futtermittel, Chemikalien und Pharmazeutika in biotechnologischen anstelle von chemischen Prozessen zu produzieren (Bommarius and Riebel-Bommarius 2004). Die mehr als zehnfache Umsatzsteigerung von 383 Mio. € im Jahr 1999 auf 4,36 Mrd. € im Jahr 2018 zeigt die steigende ökonomische Bedeutung von Biotechnologie und Biokatalyse (Statista 2019a).

Ein Vorteil der Biokatalyse gegenüber der chemischen Katalyse ist die hohe Selektivität von Enzymen, sowohl im Ganzzellsystem als auch in gereinigter Form. Enzyme sind chemo-, regio- und enantioselektiv, sie katalysieren also nur bestimmte Reaktionen an bestimmten funktionellen Gruppen und produzieren oder setzen nur bestimmte Enantiomere um, was besonders für Pharmazeutika wichtig ist (Bommarius and Riebel-Bommarius 2004). Außerdem laufen biokatalytische Prozesse unter milden Temperaturen und niedrigem Druck ab, sodass der Energieverbrauch im Vergleich zu chemischen Prozessen gesenkt werden kann. Reaktionen finden meist in wässrigen Medien statt und die Biokatalysatoren selbst sind nicht toxisch, biologisch abbaubar und mithilfe nachwachsender Rohstoffe produzierbar (Patel 2016; Grunwald 2017). Trotz dieser Vorteile ist der Einsatz von gereinigten Enzymen in der industriellen Produktion oft durch eine geringe Langzeitstabilität, schwierige Rückgewinnung und Wiederverwendbarkeit eingeschränkt. Diese Nachteile können durch Protein Engineering und Enzymimmobilisierung adressiert werden. Durch Protein Engineering können Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität, Selektivität und Stabilität verbessert sowie die Substratspezifität verändert werden (Bornscheuer et al. 2012). Durch Immobilisierung werden die Enzyme von der flüssigen in eine partikuläre Form überführt und können so leichter vom Produkt getrennt und damit auch Proteinverunreinigungen vom Produkt durch das Enzym selbst minimiert werden. Außerdem sind die Enzyme in immobilisierter Form stabiler und können wiederverwendet werden (Sheldon and van Pelt 2013).

1.2 Biopharmazeutika und β -Lactam-Antibiotika

Ein wichtiges Anwendungsgebiet der Biotechnologie ist die Entwicklung und Produktion von Pharmazeutika. Heute werden etwa 30 % der Pharmazeutika biotechnologisch hergestellt, mit weiter steigender Tendenz (Statista 2019b). Biopharmazeutika sind oft sehr komplexe Moleküle, die meist nicht chemisch hergestellt werden können. Früher wurden diese Substanzen teilweise aus menschlichen oder tierischen Organen isoliert. Heute können sie biotechnologisch durch rekombinante Proteinproduktion und Biokatalyse einfacher und in ausreichenden Mengen hergestellt werden (Sahm et al. 2013; Overton 2014). Beispiele für biotechnologisch hergestellte Pharmazeutika sind Insulin, das früher aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen isoliert werden musste, Impfstoffe

beispielsweise gegen Gebärmutterhalskrebs oder Hepatitis B und monoklonale Antikörper (Sahm et al. 2013).

Auch Antibiotika werden biopharmazeutisch hergestellt. Ihren Anfang fand die Verwendung und Produktion von Antibiotika 1928 in der zufälligen Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming. Fleming stellte fest, dass einige Pilze der Gattung *Penicillium* antibakterielle Substanzen, die das Wachstum von *Staphylococcus* Stämmen hemmen, produzieren können (Fleming 1929). In den 1930er und 40er Jahren kam es zu ersten Anwendungen im Menschen mit positiven Ergebnissen (Campos Muñiz et al. 2007). Über die letzten 50 Jahre ist der Einsatz von Antibiotika weltweit stark gestiegen, wodurch die Todesrate bei vielen Infektionskrankheiten deutlich gesenkt wurde. Allerdings hat dieser hohe Einsatz von Antibiotika, der auch den unnötigen Gebrauch und eine falsche Verwendung beinhaltet, zur Bildung einer Vielzahl antibiotikaresistenter Bakterien geführt (Filippini et al. 2006; Boeckel et al. 2014). Bereits in den 1960ern wurde Penicillin G aufgrund von Resistenzbildung gegen einige Bakterienarten langsam unwirksam (Basso and Serban 2019). Um Krankheiten, die diese resistenten Bakterien auslösen, wieder bekämpfen zu können, ist die Entwicklung neuartiger Antibiotika notwendig, die dann erfolgreich gegen resistente Bakterien eingesetzt werden können. Eine gute Perspektive bietet hier das Enzym Penicillin G Acylase, das die Reaktion zur Synthese neuer, aktiver semi-synthetische β -Lactam-Antibiotika katalysieren kann (Buchholz 2016).

β -Lactam-Antibiotika sind durch den Besitz eines 4-gliedrigen heterozyklischen β -Lactam-Rings gekennzeichnet. Die wichtigsten Klassen der β -Lactam-Antibiotika sind die von Fleming erstmals beschriebenen Penicilline und die in den 1950-Jahren entdeckten Cephalosporine (Abbildung 1). β -Lactam-Antibiotika unterbrechen die bakterielle Zellwandbildung, indem sie die Peptidoglykan-Transpeptidasen hemmen und so in Bakterienkulturen bakterizid wirken. Da diese Transpeptidasen nur in Bakterien vorkommen, wirken β -Lactam-Antibiotika spezifisch gegen Bakterien und haben eine geringe Toxizität auf den Menschen (Hassan 2016; Bush and Bradford 2016; Cobos-Puc et al. 2020).

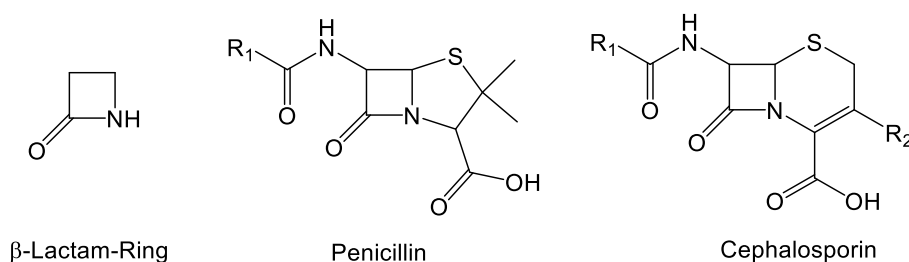


Abbildung 1: Strukturformeln des β -Lactam-Rings, von Penicillinen und Cephalosporinen.

1.3 Penicillin G Acylase

Penicillin G Acylase (PGA), auch Penicillin Amidase oder Penicillin Amidohydrolase (EC-Nummer 3.5.1.11), wird industriell zur Produktion semi-synthetischer β -Lactam-Antibiotika eingesetzt.

1.3.1 Entdeckung und industrielle Anwendung der Penicillin G Acylase

β -Lactam-Antibiotika sind mit einem Marktanteil von 65 % die wichtigste Gruppe unter den Antibiotika. Die jährliche Menge an PGA zur Produktion einer Reihe dieser Antibiotika wird zwischen 10 und 30 Mio. t geschätzt (Marešová et al. 2014).

Die Entdeckung von PGAs aus verschiedenen Organismen und die Bestätigung ihrer hydrolytischen Aktivität durch Nachweis von 6-Aminopenicillansäure (6-APA) wurde Ende der 1950er und Anfang der 1960er Jahre von verschiedenen Forschungsgruppen publiziert (Batchelor et al. 1959; Claridge et al. 1960; Huang et al. 1960; Rolinson et al. 1960), nachdem Enzyme mit PGA-Aktivität schon 1950 postuliert wurden, aber noch kein Beweis erbracht werden konnte (Sakaguchi and Murao 1950). Die neu entdeckten PGAs wurden zunächst zur Hydrolyse von Penicillin G und verwandter Verbindungen zu 6-APA, einem wichtigen Verläufermolekül für die Synthese semi-synthetischer Penicilline, und einer organischen Säure wie Phenyllessigsäure (PAA) als Nebenprodukt eingesetzt (Abbildung 2). Damit ersetzen sie die traditionellen chemischen Transformationen. Außerdem können PGAs auch die Hydrolyse von Cephalosporin G oder Cephalosporin C zu 7-Amino-desacetoxy-cephalosporansäure (7-ADCA) oder 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) und organischen Säuren katalysieren (Chandel et al. 2008; Srirangan et al. 2013; Basso and Serban 2019). Aber auch für die Kondensationsreaktion von 6-APA, 7-ADCA, 7-ACA sowie weiterer Intermediate mit verschiedenen Acyldonoren zur Synthese semi-synthetischer β -Lactam-Antibiotika wie Amoxicillin oder Cefalexin werden PGAs eingesetzt (Marešová et al. 2014) (Abbildung 2). Solche semi-synthetischen Antibiotika können gegenüber natürlichen Antibiotika die Vorteile einer höheren Wirksamkeit und Wirkstärke, einem breiteren antimikrobiellen Spektrum und verbesserter pharmakologischer Eigenschaften haben. Außerdem weisen semi-synthetische Antibiotika meist eine erhöhte Stabilität, geringere Toxizität, leichtere Absorption und weniger Nebenwirkungen auf (Valle et al. 1991; Parmar et al. 2000; Srirangan et al. 2013).

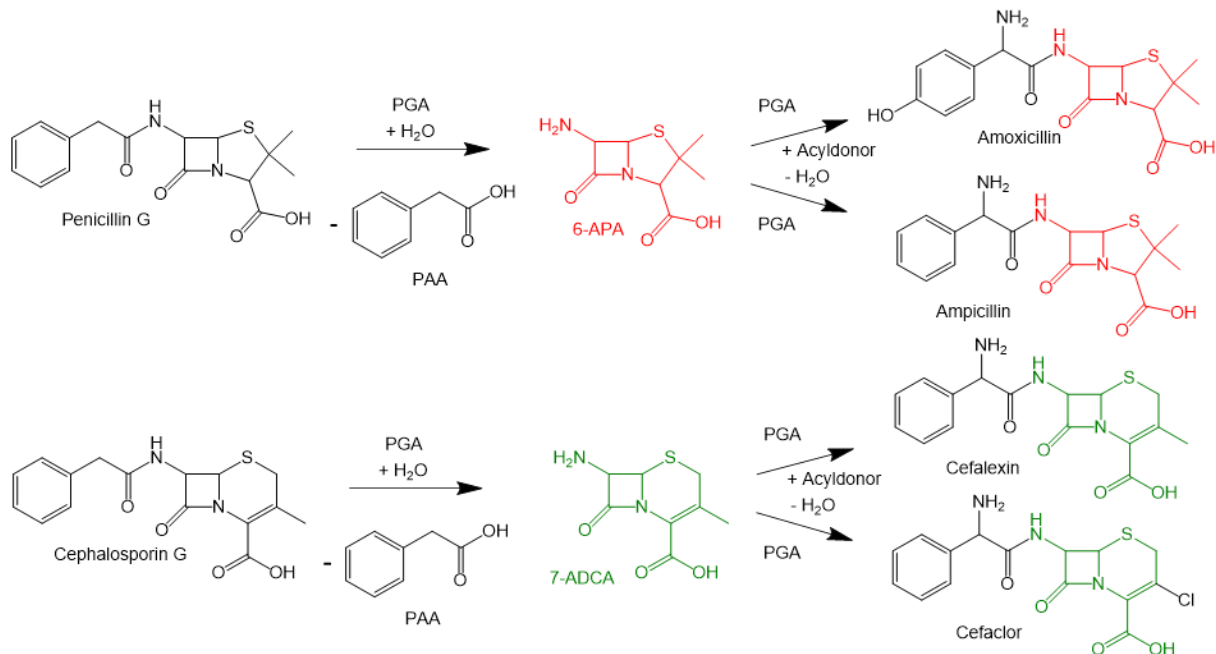


Abbildung 2: Beispiele für von PGA katalysierte Hydrolyse- und Synthese-Reaktionen. Aus Penicillin G und Cephalosporin G können durch Hydrolyse die Vorläufermoleküle 6-Aminopenicillansäure (6-APA) und 7-Amino-desacetoxy-cephalosporansäure (7-ADCA) gewonnen und für die Synthese von Amoxicillin, Ampicillin, Cefalexin, Cefaclor und weiterer semi-synthetischer β -Lactam-Antibiotika eingesetzt werden, modifiziert nach Srirangan et al. (2013) und Lakowitz (2017).

Über die Jahre wurden PGAs durch Protein Engineering und Immobilisierung sowohl für die industrielle Hydrolyse natürlicher β -Lactam-Antibiotika als auch für die Synthese semi-synthetischer Antibiotika angepasst. Dabei werden diese industriell mithilfe zweier unterschiedlicher PGAs hergestellt. Eine

sogenannte HydPGA katalysiert die Hydrolyse von Penicillin G oder Cephalosporinen und eine SynPGA katalysiert die Synthese semi-synthetischer β -Lactam-Antibiotika wie Ampicillin oder Amoxicillin (Basso and Serban 2019). In der Industrie werden meist die PGAs aus *Escherichia coli* ATCC11105 und *Bacillus megaterium* ATCC14945 oder Varianten dieser zwei PGAs verwendet (Rajendhran and Gunasekaran 2004). Für die Produktion der PGA erwies sich die Fed-Batch-Kultivierung mit hoher Biomasse- und damit auch hoher Enzymproduktion mithilfe komplexer, günstiger Kohlenstoff- und Stickstoffquellen gefolgt von einer Reinigung durch Adsorption als industriell geeignet (Chandel et al. 2008). Die folgende enzymatische Spaltung von Penicillin G zu 6-APA und auch die enzymatische Synthese von β -Lactam-Antibiotika finden dann als Batch-Kultivierung im wässrigen Medium mit immobilisierter PGA statt. Die PGA wird dabei meist auf hydrophilen Harzen wie Epoxymethacrylat immobilisiert und kann bis zu 1000-mal wiederverwendet werden (Basso and Serban 2019).

1.3.2 Vorkommen, Struktur und Reaktion von PGAs

PGAs kommen in Gram-negativen Bakterien wie z. B. *E. coli* (Cole 1969), *Achromobacter* spp. (Grulich et al. 2016), *Alcaligenes faecalis* (Varshney et al. 2012), *Kluyvera citrophila* (Varshney et al. 2013), *Paracoccus denitrificans* (Panigrahi et al. 2015) und *Providencia rettgeri* (Pan et al. 2018) sowie in Gram-positiven Bakterien wie *Arthrobacter viscosus* (Ohashi et al. 1988), *Bacillus badius* (Rajendhran and Gunasekaran 2007) und *B. megaterium* (Chiang and Bennett 1967), aber auch in Eukaryoten wie Pilzen und Hefen vor. Eukaryotische PGAs sind allerdings in Forschung und Industrie weniger relevant (Cobos-Puc et al. 2020). Obwohl alle Enzyme aus den genannten Organismen die gleiche Reaktion, die Spaltung einer Amidbindung, katalysieren, können Substratspezifität und Aktivität von PGAs unterschiedlichen Ursprungs verschieden sein (Li et al. 2020). Über die natürliche Funktion von PGAs ist bisher wenig bekannt. Eine mögliche Funktion ist die Metabolisierung von heterozyklischen Verbindungen als Kohlenstoffquelle (Tishkov et al. 2010).

Bakterielle PGAs sind heterodimere Proteine bestehend aus einer kleineren, etwa 25 kDa großen α -Untereinheit und einer größeren, etwa 60 kDa großen β -Untereinheit. Beide Untereinheiten sind in einem *pga*-Gen codiert. Nach Transkription und Translation liegt intrazellulär zunächst die einkettige PräproPGA vor, welche aus einem N-terminalen Signalpeptid (SP), gefolgt von α -Untereinheit, Linker (L) und β -Untereinheit besteht (Abbildung 3). Das N-terminale Signalpeptid ist für die Translokation zuständig und wird nach Transport durch die Membran abgespalten, sodass die ProPGA bestehend aus den beiden Untereinheiten verbunden durch den Linker außerhalb der Zellmembran vorliegt (Rajendhran and Gunasekaran 2004). In Gram-negativen Bakterien liegen die ProPGAs im Periplasma vor, während ProPGAs bei Gram-positiven Bakterien durch das Fehlen einer äußeren Membran direkt in das umgebende Kulturmedium entlassen werden. Dies kann die Reinigung erleichtern und so Downstreamprocessing-Kosten senken (Yang et al. 2006). Nach der Translokation der ProPGA findet die Prozessierung in die heterodimere PGA-Form durch autokatalytische Entfernung des Linkers im Periplasma oder im Medium statt. Da der Linker in der gefalteten ProPGA noch über dem aktiven Zentrum liegt und dieses so blockiert, bewirkt die Abspaltung gleichzeitig die Überführung in den aktiven Zustand (Hewitt et al. 2000).

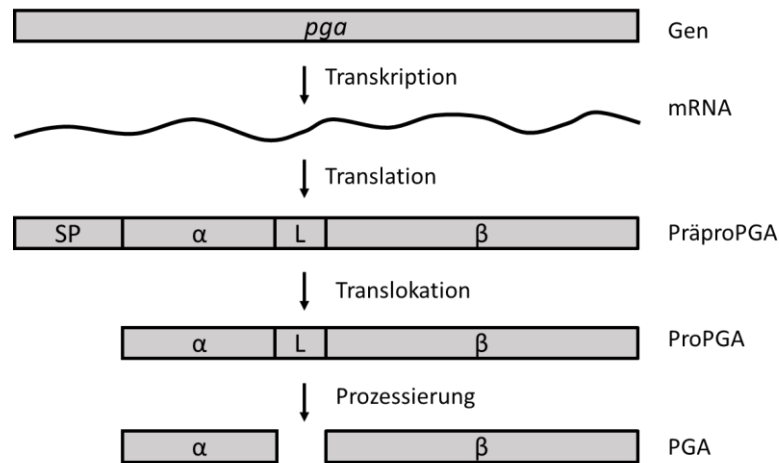


Abbildung 3: Schritte der PGA-Synthese in Bakterien. Nach der Proteinbiosynthese wird die PräproPGA bestehend aus Signalpeptid (SP), α -Untereinheit, Linker (L) und β -Untereinheit in das Periplasma (Gram-negative Bakterien) oder das umgebende Medium (Gram-positive Bakterien) transloziert und das SP dabei abgespalten. Anschließend wird die PGA in die heterodimere, aktive Form prozessiert. Modifiziert nach Rajendhran und Gunasekaran (2004).

Die Aufklärung der PGA-Enzymstruktur durch Röntgenstrukturanalyse ermöglichte die Ermittlung der Substratbindestelle und des aktiven Zentrums sowie die Aufklärung des katalytischen Mechanismus (Srirangan et al. 2013). Bisher wurden Kristallstrukturen von PGAs aus den Gram-negativen Organismen *E. coli* (Duggleby et al. 1995), *A. faecalis* (Varshney et al. 2012), *K. citrophila* (Chand et al. 2015) und *P. rettgeri* (McDonough et al. 1999) gelöst. PGAs von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien zeigen eine Aminosäure-Sequenzidentität von nur etwa 30 %. Allerdings wurde vor dem Start dieser Arbeit keine Kristallstruktur einer PGA aus einem Gram-positiven Bakterium veröffentlicht, obwohl die Kristallisation der PGA aus *B. megaterium* (BmPGA) bereits gezeigt wurde (Rojviriya et al. 2011).

PGAs gehören zur Superfamilie der N-terminalen nucleophilen (Ntn)-Hydrolasen, die die Spaltung oder Bildung einer Amidbindung katalysieren. Diese enthalten als aktives Zentrum eine katalytisch aktive Aminosäure wie Serin, Cystein oder Threonin am N-Terminus. Im Falle der PGA befindet sich ein katalytisch aktives Serin am N-Terminus der β -Untereinheit (Srirangan et al. 2013). Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus von PGAs ist am Beispiel der Hydrolyse von Penicillin G zu 6-APA und PAA katalysiert durch die PGA aus *E. coli* dargestellt (Abbildung 4). Durch den nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe des N-terminalen Serins der β -Untereinheit (Ser β 1) auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung von Penicillin G entsteht ein kovalenter, tetraedrischer Übergangszustand in Form eines Acyl-Enzym-Komplexes. Dieser wird durch Asn β 241 und Ala β 69 über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Durch den Zerfall des Übergangszustands wird das erste Produkt der Hydrolyse, 6-APA, freigesetzt. Anschließend wird das Enzym durch einen erneuten nucleophilen Angriff von H₂O über einen erneuten tetraedrischen Übergangszustand deacetyliert. Das zweite Produkt PAA wird abgespalten, wodurch das Enzym wieder frei vorliegt. Dieser Reaktionsmechanismus verläuft ähnlich wie bei Serinproteasen. Im Gegensatz zur katalytischen Triade von Serinproteasen gibt es bei PGAs aber keine Histidin- und Asparaginsäurereste zur Erhöhung der Nucleophilie des katalytischen Serins in unmittelbarer Nähe. Bei PGAs wird die Nucleophilie gesteigert, indem die α -Aminogruppe des Serins über ein zwischengeschaltetes Wassermolekül die negative Partialladung des Hydroxyl-

Sauerstoffs erhöht, wobei der Stickstoff der Aminogruppe als Base agiert. Neben der hier dargestellten Hydrolyse können PGAs auch die Synthese-Reaktion katalysieren. Da alle Schritte reversibel sind, kann die Kondensation von Acylgruppen und einem β -Lactam wie 6-APA in wässriger Umgebung bei sauren pH-Werten stattfinden (Duggleby et al. 1995; Srirangan et al. 2013; Li et al. 2020).

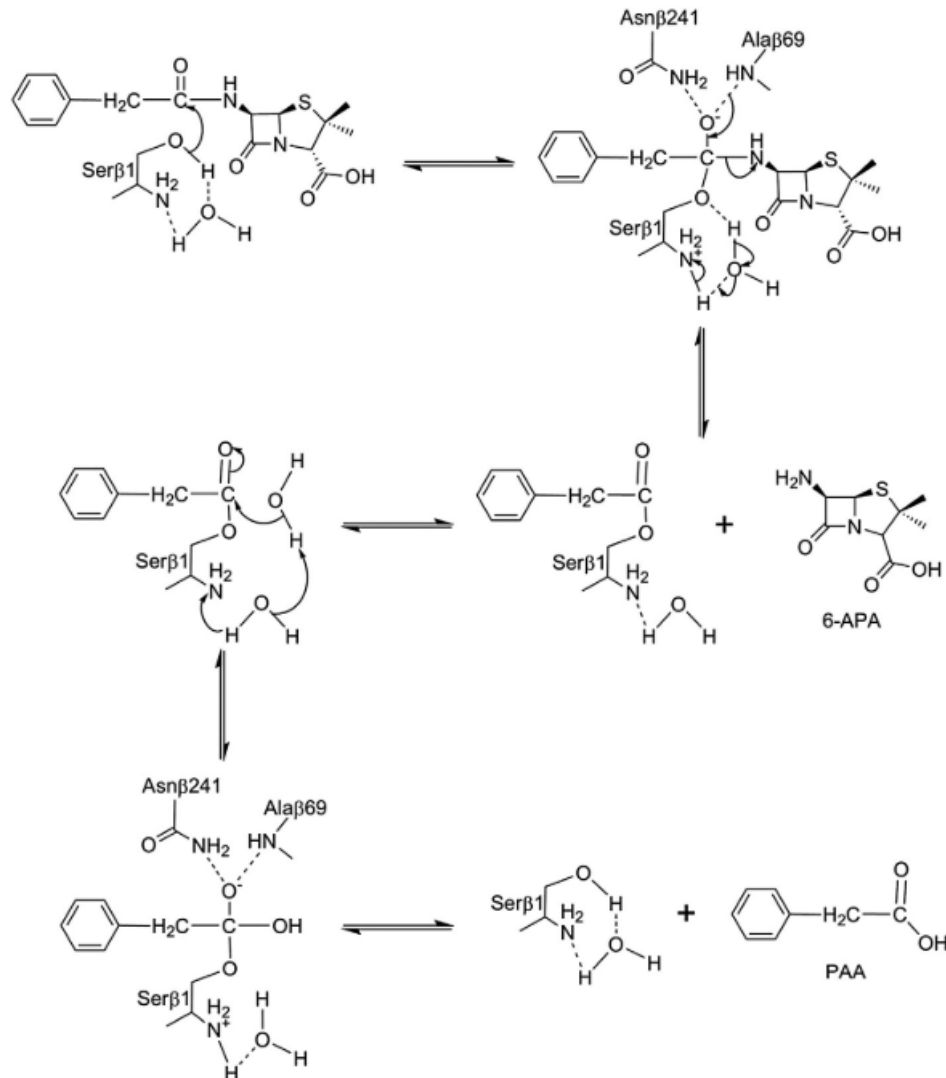


Abbildung 4: Vorgeschlagener Mechanismus der Hydrolyse von Penicillin G zu 6-APA und PAA katalysiert von der EcPGA. An der Katalyse beteiligt sind Serβ1 als Nucleophil und Teil des tetraedrischen Acylenzym-Komplexes und Asnβ241 und Alaβ69 zur Stabilisierung dieses Übergangszustandes (Srirangan et al. 2013).

1.4 Protein Engineering

Die Anwendung von Biokatalyse durch den Menschen hat sich seit Entdeckung, dass Mikroorganismen gewünschte Reaktionen beim Bierbrauen oder bei der Fermentation von Lebensmitteln katalysieren können, bis heute, zur großtechnischen Produktion von Chemikalien und Pharmazeutika mit isolierten Enzymen, stark verändert. Enzyme wurden über Millionen von Jahren durch Evolution „entwickelt“, um in Organismen gezielt Reaktionen zu katalysieren. Allerdings unterscheiden sich die Reaktionsbedingungen in industriellen Prozessen stark von den physiologischen Bedingungen im Organismus (Lutz 2010; Martinez and Schwaneberg 2013). Um einen Einsatz von Enzymen in der

industriellen Biokatalyse zu ermöglichen, können diese mittels Protein Engineering so verändert werden, dass sie eine hohe Aktivität, Selektivität und Stabilität unter Prozessbedingungen zeigen (Bommarius et al. 2011; Davids et al. 2013).

1.4.1 Rationales Proteindesign und gerichtete Enzymevolution

Zwei Strategien des Protein Engineering, um maßgeschneiderte Enzyme zu erhalten, sind die gerichtete Evolution und das rationale Proteindesign (Abbildung 5) (Bornscheuer and Pohl 2001).

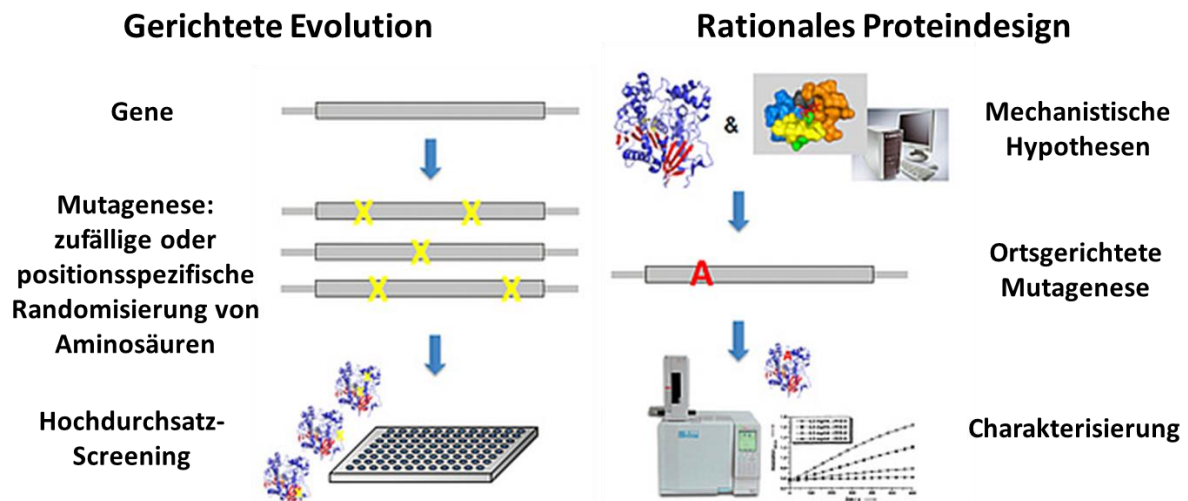


Abbildung 5: Optimierung von Enzymen für biotechnologische Anwendungen durch gerichtete Evolution und rationales Proteindesign. Modifiziert nach Kourist (2018).

Bei der gerichteten Enzymevolution können neue und verbesserte Biokatalysatoren durch iterative Mutagenese- und Screening-Durchläufe unter einem bestimmten Selektionsdruck generiert werden (Martinez and Schwaneberg 2013). Mithilfe molekularbiologischer Methoden wird die Darwin'sche Evolution dabei *in vitro* nachgeahmt (Bornscheuer et al. 2012). Nach Auswahl eines Zielenzyms mit der gewünschten Funktion wird das entsprechende Gen zufällig mutiert und anschließend in einem Hochdurchsatz-Screening nach Enzymen mit verbesserten Eigenschaften gesucht. Diese Varianten können für weitere Mutations- und Screening-Runden genutzt und vorteilhafte Mutationen neu kombiniert werden (Jaeger et al. 2001; Arnold 2018). Die Bedeutsamkeit der gerichteten Evolution zur nachhaltigeren Produktion von Chemikalien, Biokraftstoffen und Medikamenten zeigt sich auch in der Verleihung des Nobelpreises in Chemie 2018 an Frances Arnold für ihre Pionierarbeit und Erfolge in der Proteinevolutionsforschung seit den 1990ern (Jones 2018; Gibney et al. 2018). Die größten Vorteile der gerichteten Enzymevolution sind, dass keine Informationen nötig sind, wie Enzymstruktur und Funktion zusammenhängen, dass auch vorteilhafte Austausche von Resten entfernt des aktiven Zentrums gefunden werden können und dass neue Funktionen von Enzymen für die Industrie nutzbar gemacht werden können. Allerdings können bei dieser Methode sehr viele unterschiedliche Varianten des Enzyms entstehen, sodass ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren für jedes neue Enzym individuell entwickelt werden und die apparative Ausstattung vorhanden sein muss (Chen 2001; Arnold 2018).

Im Gegensatz dazu werden beim rationalen Proteindesign gezielt ortsspezifische Mutationen basierend auf Kenntnissen der Proteinstruktur, der Funktion und des Reaktionsmechanismus sowie

deren Zusammenhang in Zielproteine eingefügt, um so Aktivität, Selektivität oder Stabilität zu verbessern (Chen 2001). Verschiedene Computer-basierte Methoden können genutzt werden, um funktionale Aminosäurereste zu identifizieren. Durch Multiple Sequenzalignments von verwandten Enzymen können z. B. funktionale oder konservierte Aminosäuren bestimmt werden. Effektiver ist allerdings eine bioinformatische Berechnung basierend auf strukturellen Enzymdaten, die mit der Funktion verbunden sind (Lutz 2010; Davids et al. 2013). Verwendet werden beispielsweise Programme wie FoldX zur Berechnung der freien Enthalpie, um den Effekt von Mutationen auf die Stabilität von Enzymen zu ermitteln (Schymkowitz et al. 2005; Buß et al. 2018) oder das Rosetta Software-Paket zur Proteinstruktur-Vorhersage und Enzymdesign (Kaufmann et al. 2010). Mit dem Webserver HotSpot Wizard können automatisch Hotspots in der Enzymstruktur identifiziert werden, an denen eine Veränderung zu einer verbesserten Stabilität, Aktivität, Substratspezifität und Enantioselektivität führen könnte. Dazu sind eine Vielzahl von Einzelalgorithmen wie z. B. BLAST, CAVER, FoldX oder Rosetta verknüpft (Sumbalova et al. 2018). Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit von Proteinen bietet die Methode zur Reduktion der Oberflächenentropie mit dem SERp Server (engl. surface entropy reduction prediction) (Goldschmidt et al. 2007). Zusammenfassend können durch den Einsatz von rationalem Proteindesign mit Computer-basierten Methoden kleinere, funktionale Bibliotheken erstellt und Enzyme so effektiv verbessert werden (Lutz 2010; Davids et al. 2013).

Weiterhin gibt es kombinierte Methoden, wie das semi-rationale Proteindesign, aus gerichteter Evolution und rationalem Design, um die Vorteile beider nutzen und verbesserte Ergebnisse erzielen zu können (Bornscheuer and Pohl 2001). Durch Nutzung von Informationen zur Sequenz, Enzymstruktur und Funktion sowie Computer-basierten Algorithmen können vielversprechende Positionen ausgewählt werden und durch zufällige Mutagenese-Methoden fokussierte Bibliotheken erstellt werden, für die nicht unbedingt ein Hochdurchsatz-Screening Assay vorhanden sein muss (Lutz 2010; Davids et al. 2013). Ein Beispiel für eine solche kombinierte Methode ist beispielsweise die Sättigungsmutagenese, bei der an einer oder mehreren Aminosäure-Positionen, die z. B. durch Computer-basierte Methoden identifiziert wurden, alle 20 möglichen Aminosäuren eingefügt und getestet werden können (Lutz 2010; Kille et al. 2013).

1.4.2 Protein Engineering von Penicillin G Acylasen

Zur kommerziellen Nutzung natürlicher Enzyme ist eine Anpassung dieser an die Bedingungen im industriellen Prozess nötig, um Aktivität, Selektivität, Spezifität und Stabilität der Enzyme für eine großtechnische Produktion zu verbessern (Martinez and Schwaneberg 2013). Für das industriell angewandte Enzym Penicillin G Acylase wurde bereits eine Vielzahl an Studien zur genetischen Verbesserung der Eigenschaften durchgeführt (Rajendhran and Gunasekaran 2004).

Zur Verbesserung der Aktivität wurden Aminosäurereste im aktiven Zentrum verändert, die an der Substratbindung beteiligt sind. In der PGA aus *E. coli* (EcPGA) wurden die drei Aminosäuren α R145, α F146 und β F24 gezielt über Punktmutationen durch andere Aminosäuren ersetzt. Dabei zeigte die Variante α R145L ein 6-fach verbessertes Synthese-zu-Hydrolyse (S/H)-Verhältnis für Penicillin G durch eine erhöhte Präferenz für 6-APA (Alkema et al. 2002b). Für Varianten mit Unterschieden in den

Positionen α F146 und β F24 wurden ebenfalls Änderungen in Aktivität, Interaktion mit dem Substrat und S/H-Verhältnis festgestellt (Alkema et al. 2002a). Auch in anderen bekannten PGAs wurden diese drei oder strukturell dazu homologe Aminosäuren verändert. In der PGA aus *B. megaterium* (BmPGA) wurden die Reste α Y144, α F145 und β V24 als homolog identifiziert. Bei der Doppelmutante β 24F_ α 144R konnte ein 3-fach erhöhtes S/H-Verhältnis für die Synthese von Cefalexin erreicht werden (Wang et al. 2007). Bei der PGA aus *A. faecalis* konnte mit der Variante β F24G die Produktivität bei der Ampicillin-Synthese 130-fach im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden (Deng et al. 2015).

Neben der ortsspezifischen Mutagenese als Form des rationalen Designs wurde die gerichtete Enzymevolution zur Verbesserung der Aktivität angewendet. Durch Error-prone PCR konnte beispielsweise die EcPGA Variante K297I mit 4-fach höherer spezifischer Aktivität identifiziert werden (Balci et al. 2014). Weiterhin konnte die Synthese-Aktivität zur Herstellung von Ampicillin durch Familien-Gen-Shuffling gesteigert werden. Dazu wurden die *pga*-Gene der Organismen *E. coli*, *K. citrophila* und *P. rettgeri* benutzt. Drei Hybridenzyme aus *E. coli* und *K. citrophila* mit zusätzlichen Punktmutationen zeigten eine verbesserte Synthese von Ampicillin, Amoxicillin, Cefalexin und Cefadroxil (Jager et al. 2007).

Neben der Aktivität konnte auch die Stabilität von PGAs durch Protein Engineering verbessert werden. Durch Computer-basiertes rationales Design mithilfe der Programme I-Mutant, FoldX, PROSA und SCRATCH zur Optimierung der Thermostabilität konnte eine EcPGA-Variante mit dreimal längerer Halbwertszeit bei 50 °C gefunden werden (Polizzi et al. 2006). Außerdem konnte die Stabilität der BmPGA gegenüber organischen Lösungsmitteln und deren Thermostabilität durch rationales Proteindesign erhöht werden, indem die Aminosäurereste β K427 und K430 an der Oberfläche jeweils durch Alanin ersetzt wurden (Yang et al. 2002).

1.5 Immobilisierung von Enzymen

Neben dem Protein Engineering hat auch die Enzymimmobilisierung großes Potential, Enzyme für die industrielle Biokatalyse zu optimieren, indem die Prozessstabilität und Wiederverwendbarkeit der Biokatalysatoren begünstigt wird. Weiterhin wird durch die Enzymimmobilisierung das Risiko von Produktkontamination durch das Enzym und damit eine Allergenität gesenkt sowie die Übertragung von Enzymen in den nächsten Prozessschritt verhindert. Immobilisierung von Enzymen kann deren Leistungsfähigkeit unter den gegebenen Prozessbedingungen mit erhöhten Temperaturen und pH-Werten oder der Anwesenheit organischer Lösungsmittel steigern, die Handhabung und Rückgewinnung durch eine partikuläre Form der Enzyme vereinfachen und unterschiedliche Reaktorkonfigurationen ermöglichen (Brady and Jordaan 2009; Sheldon and van Pelt 2013). Neben diesen Vorteilen gibt es auch einige Einschränkungen wie Diffusionslimitierungen und dadurch geringere Aktivitäten des Enzyms, Kosten für Träger und Fouling, welche durch optimale Prozessbedingungen gering gehalten werden können (Basso and Serban 2019).

Enzyme können durch verschiedene Methoden immobilisiert werden. Zum einen können sie durch physikalischen Einschluss in einer Matrix eingelagert oder in einer Membran eingeschlossen werden. Zum anderen können Enzyme auch durch chemische Bindung immobilisiert werden (Abbildung 6). Hier

lässt sich zwischen der Bindung an einen Träger durch ionische, adsorptive oder kovalente Wechselwirkung und der Eigenimmobilisierung unterscheiden. Unter Eigenimmobilisierung wird die Quervernetzung von Enzymen als quervernetzte Enzymaggregate (CLEAs, cross-linked enzyme aggregate) oder quervernetzte Enzymkristalle (CLECs, cross-linked enzyme crystal) verstanden (Hartmeier 1985).

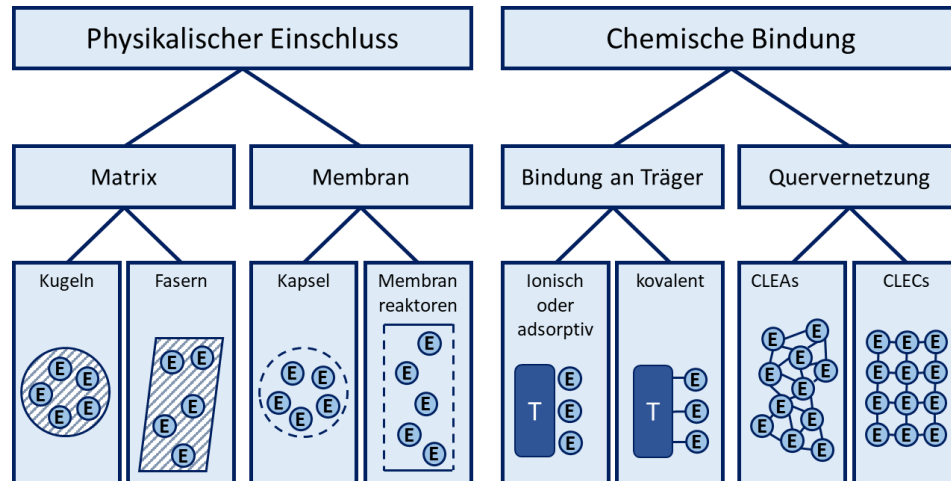


Abbildung 6: Arten der Immobilisierung von Enzymen. E = Enzym, T = Trägermaterial, CLEA = cross-linked enzyme aggregate, CLEC = cross-linked enzyme crystal. Modifiziert nach Hartmeier (1985).

Der physikalische Einschluss ist die einfachste Art der Immobilisierung, allerdings kommt es oft zu Massentransferlimitierungen und einer geringen Enzymbeladung (Bilal et al. 2019). Außerdem sind physikalische Interaktionen oft nicht stark genug, um einem Enzymaustritt vollständig zu verhindern (Sheldon and van Pelt 2013). Dieses Problem zeigt sich auch bei der einfachen und günstigen adsorptiven Bindung von Enzymen an Träger (Brady and Jordaan 2009). Kovalente Bindungen an Trägermaterialien eignen sich am besten, um Enzyme wirkungsvoll zurückzuhalten. Allerdings sind sie nicht reversibel, sodass das Trägermaterial nicht regeneriert werden kann (Sheldon and van Pelt 2013; Brena et al. 2013). Außerdem kann es bei Träger-basierten Methoden zu verringerten Raum-Zeit-Ausbeuten und verringerter Produktivität kommen, da dem System durch den Träger eine große nicht-katalytische Masse zugefügt wird. Deshalb bildet die Eigenimmobilisierung von Enzymen durch Quervernetzung eine gute Alternative. CLEAs und CLECs sind günstig trägerfrei zu produzieren. Sie weisen eine hohe Stabilität sowie eine hohe Enzymladung, also einen hohen Anteil Enzym an der Gesamtmasse des immobilisierten Biokatalysators, und damit verbundene hohe Aktivität und Produktivität auf (Sheldon and van Pelt 2013).

1.5.1 Quervernetzte Enzymkristalle zur Anwendung als immobilisierte Biokatalysatoren

Eine Möglichkeit zur trägerlosen Immobilisierung von Enzymen sind quervernetzte Enzymkristalle (CLECs). Dazu wird das Enzym zunächst in wässrigen Pufferbedingungen bei optimalem pH-Wert kristallisiert und die Kristalle anschließend durch Zugabe eines bifunktionalen Reagenzes, meist Glutaraldehyd, kovalent quervernetzt (Abbildung 7). Die entstehenden CLECs sind robuste und hochaktive immobilisierte Biokatalysatoren (Sheldon and van Pelt 2013).

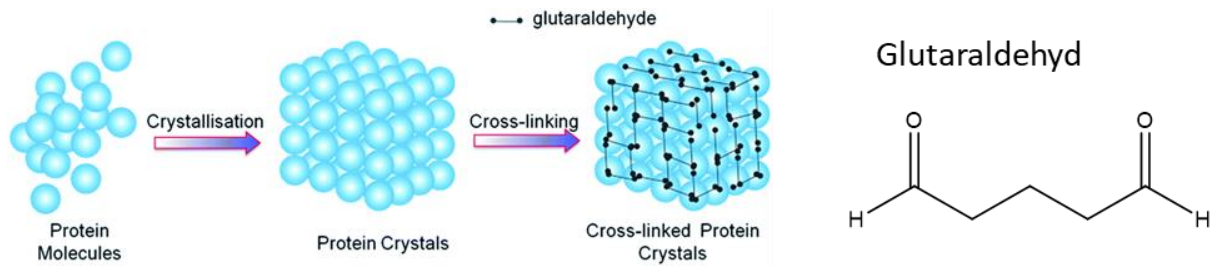


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung quervernetzter Proteinkristalle (Yan et al. 2015). Daneben ist die Strukturformel des Quervernetzlers Glutaraldehyd dargestellt.

Erstmals wurde die Herstellung von CLECs des Enzyms Carboxypeptidase A 1964 beschrieben. Weil große Proteinkristalle sehr zerbrechlich sind und sich bei Pufferwechseln schnell auflösten, wurden Kristalle für eine Strukturaufklärung zur Stabilisierung mit Glutaraldehyd vernetzt. Die vernetzten Kristalle lösten sich nicht mehr in Wasser und brachen nicht. Außerdem behielten die Enzyme ihre katalytische Aktivität und konnten durch Sedimentation oder Filtration abgetrennt werden, weshalb schon damals die Verwendung als Biokatalysator angedacht wurde (Quioco and Richards 1964). Dazu kam es allerdings erst viele Jahre später. In einem 1992 publizierten Artikel wird beschrieben, dass chemisch quervernetzte Thermolysin-Kristalle hergestellt wurden, die eine bessere Stabilität gegenüber extremen Temperaturen, pH-Werten, Proteasen und organischen Lösungsmitteln zeigten und deren Aktivität selbst nach Lyophilisation und Rehydratation wiederhergestellt werden konnte (St. Clair and Navia 1992). Ebenfalls in den 1990er Jahren wurde die Anwendung von CLECs von der Firma Altus Biologics kommerzialisiert (Sheldon and van Pelt 2013). Die fünf Enzyme Thermolysin, Subtilisin, Lipasen aus *Candida rugosa* und *Pseudomonas cepacia* sowie Penicillin G Acylase aus *E. coli* wurden im Multikilogramm-Maßstab als CLECs produziert (Margolin 1996). PGA-CLECs zeigten beispielsweise eine deutlich höhere volumetrische Aktivität als Penicillin G Acylase, die auf Eupergit als Träger immobilisiert war (Tischer and Kasche 1999).

CLECs sind interessante Biokatalysatoren, da sie die Vorteile freier Enzyme wie hohe Aktivität und Chemo-, Regio- und Enantioselektivität unter milden Reaktionsbedingungen und die von heterogenen Katalysatoren wie Stabilität in verschiedenen Umgebungen und Wiederverwendbarkeit miteinander verbinden (Margolin 1996). CLECs können Reaktionen bei höheren Temperaturen als freie Enzyme sowie unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln katalysieren und so eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit ermöglichen bzw. in Wasser unlösliche Substrate verwenden. Die Quervernetzung der Enzyme verhindert dabei deren Denaturierung (Roy and Abraham 2004). Weiterhin sind CLECs sehr stabil gegenüber der Degradation durch Proteasen, da die für den Abbau nötigen Protein-Protein-Interaktionen durch die begrenzte Zugänglichkeit des Kristallgitters für Proteasen erschwert wird. Die katalytische Aktivität der einzelnen Enzyme bleibt in CLECs durch einen hohen Flüssigkeitsanteil im Proteinkristallen erhalten (Lopez et al. 2017). CLECs können durch Sedimentation oder Filtration abgetrennt werden, sodass das Katalyse-Produkt nicht durch Enzyme kontaminiert werden kann. Außerdem sind CLECs robuste Biokatalysatoren, die auch bei Scherstress in Rührkesselreaktoren oder Querstromfiltrationsanlagen nicht brechen (Roy and Abraham 2004). Diese operative Stabilität, leichte Abtrennbarkeit und hohe volumetrische Produktivität machen CLECs zu geeigneten Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen (Sheldon and van Pelt 2013).

Trotz vieler Vorteile, die der Einsatz von CLECs als Biokatalysatoren bietet, kommen sie industriell allerdings kaum zum Einsatz. Dies liegt vor allem an der schwierigen, aufwändigen und teuren Herstellung von CLECs im industriellen Maßstab vor allem bedingt durch die Proteinkristallisation. Diese findet meist nur unter bestimmten kritischen Bedingungen von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und hoher Proteinreinheit statt. Außerdem müssen diese kritischen Bedingungen für jedes Protein neu experimentell bestimmt werden, da eine Vorhersage nicht möglich ist (Sheldon and van Pelt 2013; Xu et al. 2018). Durch weitere Forschung im Bereich der Kristallisation könnten CLECs industriell attraktiver gemacht werden. Die Kristallisation wurde bereits als Methode zur Proteinreinigung etabliert. Durch präparative Kristallisation können anstatt von teuren, zeitaufwendigen Chromatographieschritten aus nicht-reinen Proteinlösungen nach Fällung oder Extraktion reine Proteinkristalle gewonnen werden (Hekmat 2015), sodass auch eine direkte Weiterverarbeitung zu CLECs möglich wäre.

1.5.2 Herstellung von quervernetzten Enzymkristallen

Zur Herstellung von CLECs wird das Enzym zunächst kristallisiert und dann mithilfe bifunktionaler Agenzien durch kovalente intra- und intermolekulare Bindungen quervernetzt (Roy and Abraham 2004).

1.5.2.1 Proteinkristallisation

Kristallisation wird vor allem angewendet, um Proteinstrukturen auf molekularer Ebene durch Röntgenstrukturanalyse zu klären, in Form der präparativen Kristallisation zur Proteinreinigung (Hekmat 2015) und als Ausgangssituation zur Herstellung von CLECs. Die Kristallisation von Makromolekülen wie Proteinen basiert auf einer Reihe von Prinzipien, aber auch Erfahrungen und Ideen. Wegen der Komplexität und begrenzten Verständnis der beteiligten Phänomene bleibt die Proteinkristallisation bislang ein empirischer Prozess (McPherson and Gavira 2014). Das zugrundeliegende Prinzip der Kristallisation lässt sich anhand eines Phasendiagramms erklären (Abbildung 8). An den Achsen sind die Konzentration des Fällungsmittels (engl. precipitant, x-Achse) und die Proteinkonzentration (y-Achse) aufgetragen. Der kritische Punkt der Kristallisation ist die Keimbildung, weil sie einem Phasenübergang von einem gänzlich ungeordneten (Protein in Lösung) in einen geordneten Zustand (Kristall) entspricht. Die Keimbildung erfolgt nur in der sogenannten Nukleationszone, welche durch Einstellung der experimentellen Bedingungen wie Proteinkonzentration, Fällungsmittelkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Pufferbedingungen erreicht werden kann. Kristallwachstum findet in der Nukleationszone und im metastabilen Bereich durch eine Übersättigung statt. Im Gegensatz dazu bleibt das Protein im untersättigten Bereich in Lösung, da das Gleichgewicht bereits eingestellt ist, während es in der Präzipitationszone es zu einer unerwünschten Aggregatbildung von Proteinen kommt (Wienczek 1999; McPherson and Gavira 2014; McPherson and Cudney 2014; Pichlo et al. 2016).

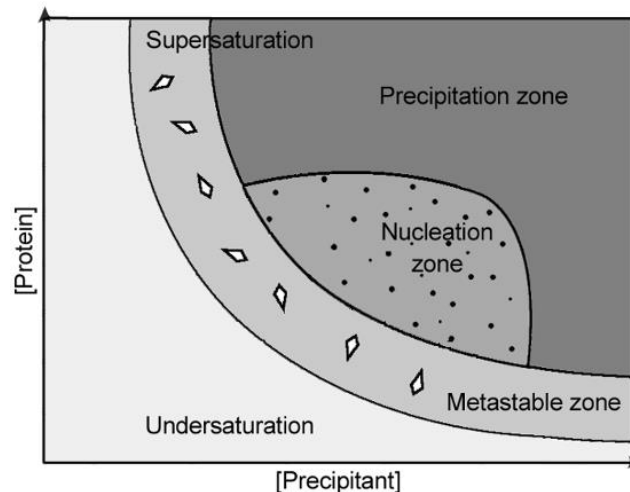


Abbildung 8: Phasendiagramm eines Protein-Kristallisationsexperimentes. Kristalle wachsen nur in einer übersättigten Lösung, die Keimbildung findet in der Nukleationszone statt und das Kristallwachstum in der metastabilen Zone (Pichlo et al. 2016).

Um eine Kristallisation von Proteinen zu erreichen, gibt es verschiedene Methoden wie die Dampfdiffusionskristallisation oder die Fällungskristallisation. Bei der am weitesten verbreiteten Dampfdiffusion wird im sogenannten Sitting- oder Hanging-Drop-Verfahren zunächst eine untersättigte Lösung aus Protein und Kristallisationspuffer mit Fällungsmittel hergestellt. Der Tropfen wird nun neben (Sitting Drop) oder über (Hanging Drop) einem bis zu 100-fach größeren Volumen des Kristallisationspuffers (Reservoir) platziert. Im Reservoir liegt meist die doppelte Konzentration des Fällungsmittels verglichen mit dem Tropfen vor. Fällungsmittel können Salze, organische Lösungsmittel oder Polymere sein. Während der Bildung des Gleichgewichts zwischen Tropfen und Reservoir verdunstet Wasser aus dem Tropfen, wodurch sich die Protein- und Fällungsmittelkonzentration erhöht und sich übersättigte Bedingungen einstellen. Dadurch können Nukleation und Kristallwachstum starten.

Bei der Fällungskristallisation werden Protein und Fällungsmittel direkt so gemischt, dass die Bedingungen in der Nukleationszone liegen, damit sofort Keimbildung und Kristallisation einsetzen können. Die Bedingungen dazu müssen in vorherigen Experimenten identifiziert und können teilweise aus Dampfdiffusionsversuchen übertragen werden (Wienczek 1999; McPherson and Gavira 2014).

Bei beiden Verfahren kann durch Zugabe von Kristallbruchstücken desselben Proteins die Kristallisation vereinfacht oder reproduzierbarer gemacht werden. Durch dieses sogenannte Seeding ist dann keine *de novo* Nukleation mehr nötig, da die Nukleationskeime bereits zugegeben werden. Die Nukleationszone muss also nicht erreicht werden. Eine Übersättigung im Bereich der metastabilen Zone ist für das Kristallwachstum ausreichend (D'Arcy et al. 2014).

1.5.2.2 Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Proteinkristalle können sich wieder auflösen, sobald die Bedingungen sich im untersättigten Bereich befinden. Um dies zu verhindern, kann eine kovalente intra- und intermolekulare Quervernetzung genutzt werden, um Auflösen der Kristalle und Denaturierung zu verhindern und so die Stabilität von Proteinkristallen zu erhöhen (Roy and Abraham 2004). Als Quervernetzungsreagenz wird für Enzyme, die in der Biokatalyse eingesetzt werden, meist Glutaraldehyd verwendet, da es Proteine effizient

vernetzt, kommerziell gut verfügbar, günstig, einfach zu handhaben und sehr reaktiv ist. Glutaraldehyd ist ein bifunktionales Reagenz, das Aminogruppen von Proteinen kovalent und irreversibel verknüpfen kann (Abbildung 7). Glutaraldehyd kann dabei in wässriger Lösung verschiedene Zustandsformen annehmen und auch mit sich selbst polymerisieren, wodurch unterschiedlich weit entfernte Aminogruppen verbunden werden können. Durch das Ausbilden sowohl vieler als auch unterschiedlich langer Bindungen sind mit Glutaraldehyd vernetzte Kristalle sowohl thermisch als auch chemisch sehr stabil. Allerdings ist die Quervernetzung in Bezug auf die Quervernetzungsstellen, Bindungslängen und Anzahl der Vernetzungen kaum vorhersagbar (Margolin and Navia 2001; Roy and Abraham 2004; Migneault et al. 2004; Barbosa et al. 2014). Durch Glutaraldehyd vernetzte Enzyme können als immobilisierte Biokatalysatoren eingesetzt werden, da die Enzyme ihre Aktivität trotz Vernetzung meist beibehalten (Barbosa et al. 2014).

1.5.3 Mechanische Eigenschaften von quervernetzten Enzymkristallen

Bei Verwendung von CLECs in biokatalytischen Prozessen ist es von Interesse, ihre mechanischen Eigenschaften in Verbindung zum Prozessdesign und -betrieb zu kennen. CLECs können beispielsweise Scherkräften durch Rühren, Querstromfiltration oder Pumpen über längere Zeit ausgesetzt sein und müssen dabei ihre Aktivität beibehalten, sollen nicht brechen und gut abtrennbar sein (Lee et al. 2002). Bisher wurden nur wenige Arbeiten zur mechanischen Stabilität von CLECs publiziert. Dabei wurde in Versuchen zur Scherstabilität eine rotierende Scherzelle verwendet, um die Beanspruchung in einem Rührkesselreaktor zu simulieren. Bei der Beanspruchung von CLECs einer Alkoholdehydrogenase im Schergerät wurde kein Bruch bei CLECs aus stäbchenförmigen Kristallen beobachtet. Bei CLECs aus hexagonalen Kristallen kam es erst bei hohen Dissipationsraten von über 10^5 W/kg zum Bruch, wohingegen nicht vernetzte Kristalle bereits bei niedrigen eingetragenen Energien brachen (Lee et al. 2002). Weiterhin wurden die mechanischen Eigenschaften von CLECs der Alkoholdehydrogenase in einem Filtrationsprozess untersucht. Auch nach fünf Zyklen kam es dabei zu keinem Kristallbruch (Vaghjani et al. 2000).

Zur Durchführung dieser Experimente in einer Scherzelle oder Filtrationsanlage sind große Mengen an CLECs mindestens im niedrigen Gramm-Bereich notwendig. Um hingegen mechanische Eigenschaften eines einzelnen CLEC zu bestimmen, eignet sich die Methode der Nanoindentation mithilfe eines Rasterkraftmikroskops. Für CLECs einer Halohydrindehalogenase konnten bereits mechanische Kennwerte wie Härte und Elastizitätsmodul berechnet werden, welche mit steigender Vernetzungszeit bis etwa 24 h zunahmen und abhängig von der gemessenen Fläche der hexagonalen CLECs waren (Kubiak et al. 2019).

1.6 Proteinsekretion in *Bacillus* species

Als Bodenbakterien sekretieren *Bacillus* spp. eine große Anzahl an Enzymen, um verschiedene Substrate des Bodens metabolisieren zu können und in dieser komplexen, sich verändernden Umgebung überleben zu können (Antelmann et al. 2001). Als Gram-positive Bakterien sind *Bacillus* spp. auch interessante Wirtsorganismen zur Produktion rekombinanter Proteine. Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien haben Gram-positive Bakterien keine äußere Membran, sodass

rekombinant produzierte Proteine direkt in das umgebende Kulturmedium sekretiert werden können. Durch die Sekretion der Proteine ist kein Zellaufschluss zur Reinigung nötig und die Bildung von Inclusion Bodies kann verhindert werden, sodass das Downstreamprocessing erleichtert wird (Hamed et al. 2018).

In *Bacillus* spp. sind für die Sekretion vier verschiedene Mechanismen bekannt (Abbildung 9). Dies sind der Secretion (Sec)-Pathway, der Twin-arginine translocation (Tat)-Pathway, die Sekretion über ATP binding cassette (ABC)-Transporter und die Typ IV Pilin Sekretion über das Com-System (Fu et al. 2007). Das zu sekretierende Protein wird als Präprotein mit N-terminalem Signalpeptid synthetisiert, das für jeden Mechanismus spezifisch ist, vom jeweiligen Translokationsapparat erkannt und nach der Translokation abgespalten wird (Tjalsma et al. 2000).

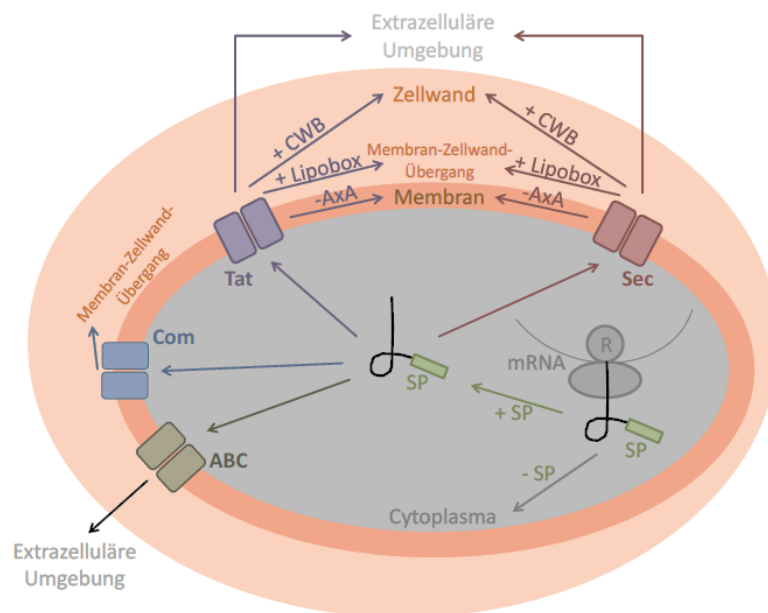


Abbildung 9: Proteinsekretion in *Bacillus* spp. (aus Lakowitz (2017)). Proteine ohne Signalpeptid (SP) bleiben nach Translation der mRNA am Ribosom (R) im Cytoplasma. Proteine mit Signalpeptid werden über ABC-Transporter, den Pseudophilin-Mechanismus (Com), den Tat- oder Sec-Pathway in die extrazelluläre Umgebung transportiert. Beim Tat- und Sec-Weg findet abhängig von Signalpeptidase-Erkennungsstelle AxA und Retentionssignal (Lipobox, CWB (engl. cell wall binding repeats)) die Translokation in die Membran, den Membran-Zellwand-Übergang, die Zellwand oder die extrazelluläre Umgebung statt.

Mit der Typ IV Pilin Sekretion über das Com-System werden in *Bacillus subtilis* Proteine transloziert, welche für die Bindung und Aufnahme von exogener DNA während der genetischen Kompetenz benötigt werden. Über ABC-Transporter werden Polypeptide mit nicht-proteinogenen Aminosäuren wie Bacteriocine oder Pheromone sekretiert (Tjalsma et al. 2000; Tjalsma et al. 2004). Der hauptsächlich genutzte Mechanismus für den Proteinexport ist der Sec-Pathway, bei dem die Proteine ungefaltete exportiert und im Bereich der Zellwand mithilfe von Chaperonen gefaltet werden. Demgegenüber werden beim alternativen Tat-Pathway, der nach zwei Arginin-Resten in der Konsensussequenz der Signalpeptide Twin-arginin Transport benannt ist, bereits im Cytosol gefaltete Proteine sekretiert, was beispielsweise den Einbau von Cofaktoren ermöglicht (Freudl 2018).

1.6.1 Secretion (Sec)-Pathway

Der Sec-Pathway ist der am häufigsten in *Bacillus* spp. genutzte Sekretionsmechanismus. Bei Untersuchungen in *B. subtilis* hat sich gezeigt, dass mehr als 90 % der sekretierten Proteine über diesen Weg transportiert werden (Yamane et al. 2004). Beim Sec-Mechanismus werden ungefaltete Proteine mit Sec-Translokationssignal in Form eines N-terminalen Signalpeptids aus dem Cytosol in die extrazelluläre Umgebung sekretiert. Dies kann über den cotranslationalen oder posttranslationalen Weg erfolgen (Abbildung 10) (Freudl 2018).

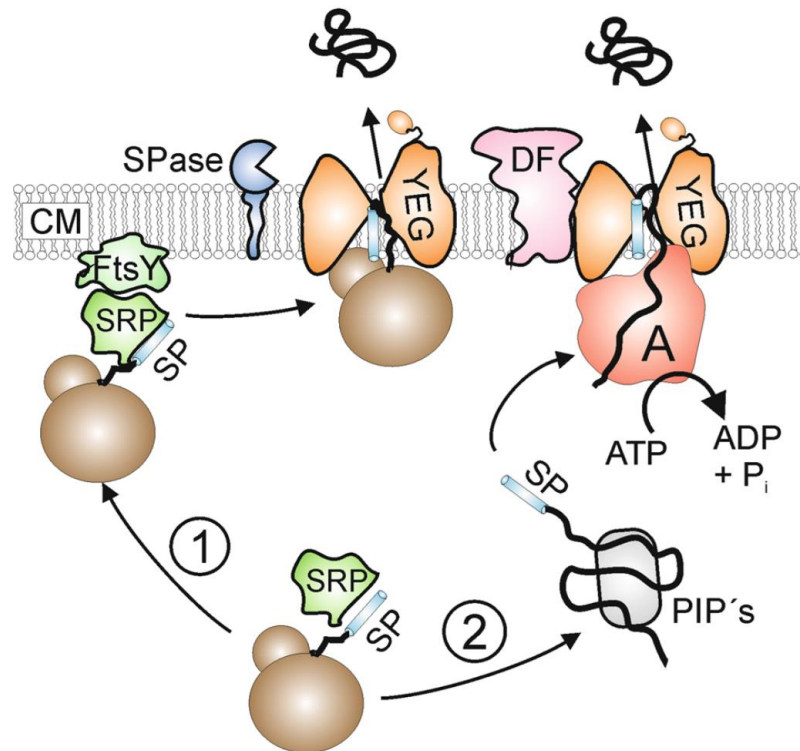


Abbildung 10: Sec-Mechanismus zur bakteriellen Proteinsekretion. Beim cotranslationalen Weg (1) werden Proteine mit stark hydrophobem Signalpeptid (SP) während der Synthese am Ribosom vom SRP (Signal recognition particle) erkannt. Der Komplex aus Ribosom, Präprotein und SRP dockt an den SRP-Rezeptor FtsY an und wird anschließend in die SecYEG-Translokationspore transferiert. Die Energie für die Translokation wird durch die weitere Elongation des Proteins am Ribosom geliefert. Beim posttranslationalen Weg (2) werden Präproteine mit Sec-Signalpeptid durch posttranslational interagierende Proteine (PIPs) erkannt und im exportierbaren Zustand gehalten. Das Signalpeptid wird durch das Protein SecA erkannt. Dieses schiebt das Protein unter ATP-Verbrauch durch die SecYEG-Translokationspore. Zusätzlich übt SecDF eine Zugkraft auf das zu exportierende Protein aus. Bei beiden Wegen wird das Signalpeptid während oder kurz nach der Translokation durch eine Signalpeptidase (SPase) entfernt, sodass das reife Protein frei an der anderen Seite der Zellmembran vorliegt (Freudl 2018).

Die Sekretion erfolgt jeweils in den Schritten Erkennung, Translokation und Freisetzung. Beim cotranslationalen Weg werden Proteine und Peptide mit stark hydrophoben Signalpeptiden während der Synthese am Ribosom vom SRP (Signal recognition particle) erkannt. Der Komplex aus Ribosom und dem entstehenden Präprotein wird durch den gebundenen SRP an den Membran-assoziierten SRP-Rezeptor FtsY angedockt und zur SecYEG-Translokationspore geführt. Anschließend wird das zu exportierende Protein vom Ribosom direkt in die Translokationspore synthetisiert, wodurch auch die Energie für die Translokation bereitgestellt wird (Freudl 2018). Beim posttranslationalen Weg werden Präproteine mit weniger hydrophoben Signalpeptiden vollständig synthetisiert. Nach Freisetzung aus

dem Ribosom interagieren diese mit posttranslational interagierenden Proteinen (PIPs) wie beispielsweise Chaperonen, um eine Aggregation zu verhindern und die Präproteine in einem entfalteten, exportierbaren Zustand zu halten. Nach Überführung an die Sec-Translokase werden die Präproteine mithilfe des ATP-abhängigen Motorproteins SecA durch die SecYEG-Translokationspore geschoben. Der assoziierte SecDF-Komplex übt zusätzlich eine Zugkraft auf das Präprotein aus. Sowohl beim co- als auch beim posttranslationalen Mechanismus wird das Signalpeptid während oder kurz nach der Translokation durch die Membran durch die Signalpeptidase (SPase) abgespalten, wodurch das Protein freigesetzt wird (Abbildung 10) (Freudl 2018).

1.6.2 Signalpeptide

Signalpeptide sind für die Translokation von Proteinen verantwortlich, indem sie die Erkennung und den Transport entsprechender Proteine zur Membran ermöglichen. Sie werden nach dem Transport durch die Membran durch SPasen abgespalten (Tjalsma et al. 2004). Signalpeptide sind N-terminal an zu sekretierenden Proteinen lokalisiert und bestehen bei Sec- und Tat-Weg aus einer positiv geladenen amino-terminalen n-Region, der zentralen hydrophoben h-Region und der polaren carboxy-terminalen c-Region. Alle drei Regionen tragen zum effizienten Proteinexport bei. Dabei wird angenommen, dass die n-Region mit der Translokationsmaschinerie interagiert und die h-Region hairpin-ähnliche Strukturen ausbilden kann, wodurch das Protein in die Membran eingeführt wird. Die c-Region trägt die SPase Erkennungssequenz, sodass das Signalpeptid vom translozierten Protein getrennt werden kann (Dalbey et al. 2012; Wang et al. 2014; Freudl 2018). Ein Vergleich der Signalpeptide der häufigsten Translokationsmechanismen, dem Sec- und dem Tat-Pathway, zeigt, dass beide die beschriebene dreigliedrige Struktur aufweisen und eine SPase-Erkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv A-X-A enthalten (Abbildung 11). Die wichtigsten Unterschiede sind die längere n-Region mit dem konservierten Motiv S/T-R-R-X-F-L-K mit den zwei namensgebenden Argininen bei Tat-Signalpeptiden. Weiterhin ist die h-Region bei Tat-Signalpeptiden weniger hydrophob und die c-Region positiv geladen, um nicht mit der Sec-Maschinerie transportiert zu werden (Freudl 2018).

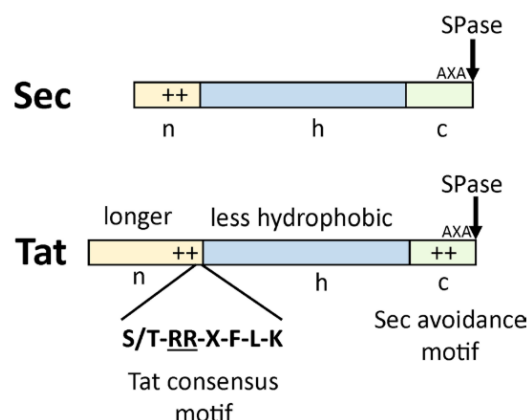


Abbildung 11: Dreigliedrige Struktur von Sec- und Tat-Signalpeptiden (Freudl 2018).

Ein Organismus besitzt aber nicht nur ein Signalpeptid für jeden Transportmechanismus. Jedes zu exportierende Protein besitzt ein eigenes, spezifisches Signalpeptid. So konnten im *B. subtilis* Stamm 168 173 (Brockmeier et al. 2006) und in *B. megaterium* DSM319 182 Sec-Signalpeptide (Baumgarten 2019) vorhergesagt werden.

Heterologe Proteine, die rekombinant produziert und sekretiert werden sollen, aber kein eigenes Signalpeptid besitzen, müssen für die Sekretion mit einem vorhandenen Signalpeptid fusioniert werden. Dabei hat sich in *B. subtilis* gezeigt, dass die Sekretion stark von der Signalpeptid-Protein-Kombination abhängig ist. Bei der Sekretion desselben Proteins mit unterschiedlichen Signalpeptiden wurden stark unterschiedliche Mengen abhängig vom Signalpeptid sekretiert. Wurden verschiedene Proteine mit dem gleichen Signalpeptid sekretiert, konnten ebenfalls große Abweichungen in der sekretierten Proteinmenge festgestellt werden. Die Wahl des Signalpeptids spielt also eine wichtige Rolle für ein heterolog zu sekretierendes Protein und bietet die Chance, die Sekretionskapazität stark zu steigern (Brockmeier et al. 2006).

1.7 *Bacillus megaterium*

1.7.1 Allgemeines

Das stäbchenförmige, hauptsächlich aerob lebende, Gram-positive und endosporenbildende Bakterium *B. megaterium* wurde erstmals 1884 von de Bary beschrieben (De Bary 1884). Seinen Namen erhielt *B. megaterium* wegen seiner überdurchschnittlichen Größe von $1,5 \times 4 \mu\text{m}$, womit das Zellvolumen ungefähr dem 100-fachen einer *E. coli*-Zelle entspricht (Abbildung 12). Wegen seiner Größe wurde *B. megaterium* in der Vergangenheit für Studien zur Aufklärung von Zellstruktur und Sporulation sowie zur Lokalisation von Proteinen genutzt (Vary et al. 2007).

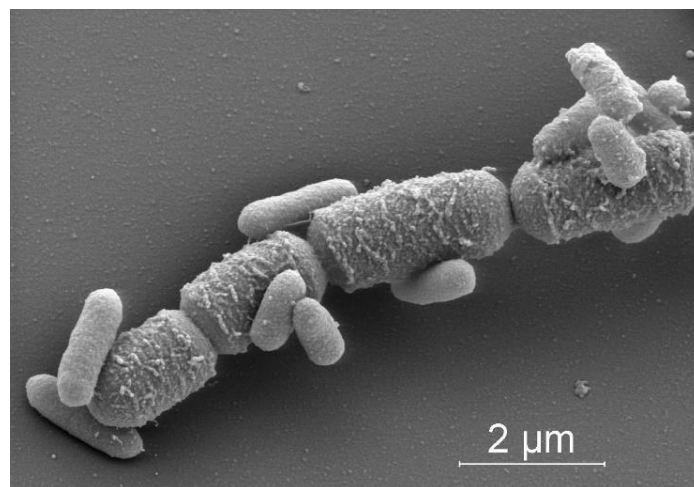


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. megaterium* (große Zellen) und *E. coli* (kleine Zellen) (Manfred Rohde, HZI, Braunschweig, 2007).

Der allgemein als Bodenbakterium bekannte *B. megaterium* kommt natürlicherweise auch in einer Reihe weiterer Habitate wie in Meerwasser, Sedimenten, auf Pflanzen, in getrockneten Lebensmitteln oder Honig vor. Diese Lebensweise in verschiedenen Umgebungen geht mit der Verstoffwechselung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen einher (Vary 1994). Diese und weitere im folgenden erläuterte Eigenschaften machen *B. megaterium* als biotechnologisches Produktionssystem interessant.

B. megaterium ist nicht pathogen und besitzt im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* keine mit der äußeren Membran assoziierten Endotoxine, wodurch der Organismus in Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt werden kann (Malten et al. 2005). Das Fehlen der äußeren Membran erlaubt außerdem die Sekretion rekombinanter Proteine direkt ins Wachstumsmedium und damit eine

vereinfachte Reinigung ohne Zellaufschluss (Biedendieck et al. 2011). Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die im Vergleich zu *B. subtilis* geringe Proteaseaktivität aufgrund des Fehlens alkalischer Proteasen, die zur Stabilität von sekretierten rekombinanten Proteinen führt (Bunk et al. 2010). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *B. megaterium* MS941 ist defizient gegenüber der extrazellulären neutralen Protease NprM, wodurch die extrazelluläre Proteaseaktivität in LB-Medium um 98,5 % reduziert werden konnte (Wittchen and Meinhardt 1995). Zur Einbringung von Plasmiden, die für rekombinante Proteine codieren, wurde 1980 die Protoplastentransformation etabliert (Brown and Carlton 1980). Die eingebrachten Plasmide weisen in *B. megaterium* auch ohne Selektionsdruck eine hohe Stabilität auf (Meinhardt et al. 1989). Zur Steuerung der rekombinanten Proteinproduktion wurde ein Xylose-induzierbares Promotor-System etabliert (Rygus and Hillen 1991). Durch Optimierung dieses System im Bereich des Promotors und der Ribosomenbindestelle konnte die Menge an rekombinant sekretiertem Protein signifikant gesteigert werden (Stammen et al. 2010).

1.7.2 Signalpeptid-Bibliothek in *Bacillus megaterium*

Um rekombinant hergestellte Proteine zur Vereinfachung des Downstreamprocessings mit *Bacillus* spp. in entsprechenden Mengen in das umgebende Medium sekretieren zu können, ist es notwendig, ein geeignetes Signalpeptid für den Export zu identifizieren. Da die Effizienz eines Signalpeptids von der Kombination mit dem jeweiligen Protein abhängt und nicht bioinformatisch vorhergesagt werden kann, müssen eine große Menge Signalpeptide für jedes rekombinante Protein neu experimentell getestet werden (Freudl 2018). Für *B. subtilis* wurde ein solches Experiment für die zwei Enzyme Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und eine Esterase unbekannten Ursprungs mit allen 173 in *B. subtilis* identifizierten Sec-Signalpeptiden durchgeführt. Dabei wurden alle Signalpeptide einzeln durch PCR amplifiziert und durch Restriktion und Ligation in den Zielvektor eingefügt (Brockmeier et al. 2006). Kommerziell ist ein solches System von TaKaRa erhältlich, in dem 173 Signalpeptide von *B. subtilis* bereits amplifiziert enthalten sind und direkt als Mix eingesetzt werden können, was allerdings ein Hochdurchsatz-Screeningsystem für jedes individuelle Protein erfordert (Yao et al. 2019). Da *B. megaterium* unter anderem den Vorteil gegenüber anderen *Bacillus* spp. hat, dass er keine alkalischen extrazellulären Proteasen besitzt und rekombinante Plasmide damit besonders stabil sind (Bunk et al. 2010), wurde auch für *B. megaterium* ein System zur Identifikation von optimalen Signalpeptid-Protein-Kombinationen entwickelt. Es handelt sich um ein plasmidbasiertes Signalpeptid-Testsystem, in das ein Ziel-Gen, kontrolliert vom Xylose-induzierbaren Promotor P_{xyIA} , und Sequenzen für die verschiedenen Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 eingebracht werden können (Abbildung 13) (Knuuti 2015). Mit dem Tool SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011) wurden 182 Sec-Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 identifiziert. Diese wurden auf zehn Multisignalpeptidplasmiden (pMSPs), jeweils in entgegengesetzter Richtung und von den Restriktionsschnittstellen BsrGI und NgoMIV getrennt, verteilt (Abbildung 14). Die Signalpeptide können durch Amplifikation der entsprechenden pMSPs in *E. coli* vermehrt werden.

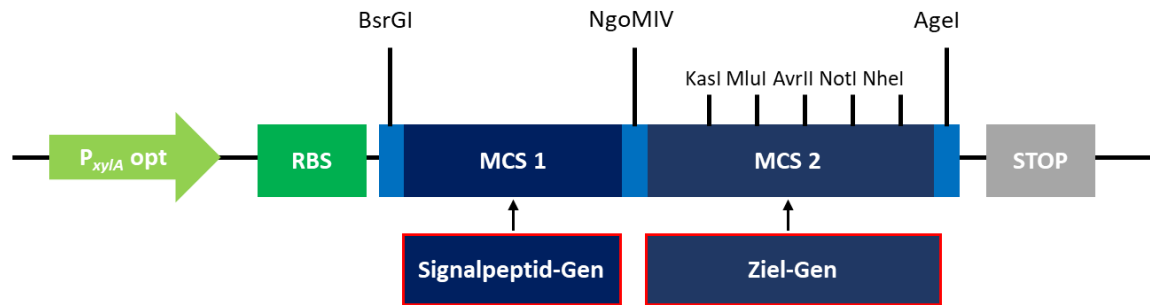


Abbildung 13: Schematische Darstellung der molekularen Bestandteile des Plasmid-Testsystems für Signalpeptide in *B. megaterium* basierend auf dem Plasmid p3STOP1623hp-MCS-HIS. In die MCS 1 können mithilfe der Schnittstellen BsrGI und NgoMIV die Signalpeptid-Gene kloniert werden und in MCS 2 über NgoMIV und eine der sechs dargestellten Schnittstellen das Ziel-Gen. Durch die NgoMIV-Schnittstelle werden im Präprotein die Aminosäuren Alanin und Glycin zwischen Signalpeptid und Ziel-Protein eingefügt (modifiziert nach Knuuti (2015)).

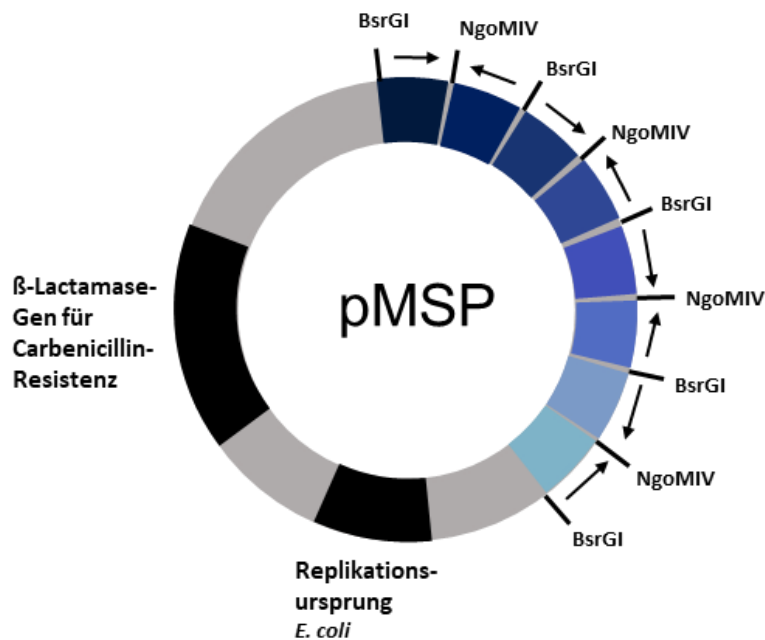


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Multisignalpeptidplasmids (pMSP). Jeweils 18 bis 20 für Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 codierende Sequenzen sind durch die Schnittstellen BsrGI und NgoMIV getrennt, die Pfeile deuten die jeweilige Orientierung der Signalpeptid-Gene an. Die pMSPs enthalten außerdem ein β -Lactamase-Gen und einen Replikationsursprung zur Amplifikation in *E. coli* (modifiziert nach Baumgarten (2019)).

Die Signalpeptid-Gene können mithilfe der Restriktionsenzyme aus den pMSPs herausgeschnitten und als Mix upstream des jeweiligen Ziel-Gens kloniert werden (Abbildung 13), wodurch Plasmide entstehen, die für unterschiedliche Signalpeptid-Protein-Kombinationen codieren. *B. megaterium* wird mit diesen Plasmiden transformiert, die Plasmidstämme aus Einzelkolonien in Screeningansätzen kultiviert und die Sekretion des Zielproteins untersucht. Nach dem Screening können vielversprechende Signalpeptide durch Kolonie-PCR und Sequenzierung identifiziert werden (Knuuti 2015; Baumgarten 2019).

2 Zielsetzung

Penicillin G Acylasen (PGAs) sind biotechnologisch relevante Enzyme, die sowohl die Hydrolyse natürlicher Penicilline und Cephalosporine zu Vorläufermolekülen als auch die Synthese semi-synthetischer β -Lactam Antibiotika aus diesen Vorläufermolekülen und einem Acyldonor katalysieren können. Industriell werden meist PGAs aus Gram-negativen Bakterien eingesetzt, die intrazellulär mit *E. coli* produziert werden. Um auch PGAs aus Gram-positiven Bakterien für eine breitere Anwendung zugänglich zu machen, sollten in dieser Arbeit zunächst neue PGAs aus *Bacillus* species identifiziert und mit *B. megaterium* produziert und sekretiert werden, um eine direkte Reinigung aus dem Kulturüberstand zu ermöglichen. Da vor dem Start dieser Arbeit noch keine Kristallstruktur einer PGA aus Gram-positiven Bakterien bekannt war, sollten die neuen PGAs kristallisiert und deren Strukturen gelöst werden, um so eine Optimierung der PGAs durch genetische Modifikationen durchführen zu können.

Für eine mögliche Anwendung sollten die identifizierten PGAs weiterhin hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten sowie ihrer thermischen und mechanischen Stabilität untersucht werden. Für die Untersuchung der mechanischen Stabilität mussten die PGAs zunächst in eine immobilisierte Form gebracht werden. Dafür sollten in dieser Arbeit quervernetzte Enzymkristalle (CLECs) hergestellt werden, die dann hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität mittels mikromechanischer Messungen mit einem Rasterkraftmikroskop untersucht werden sollten.

Weiterhin sollten die PGAs vor allem durch Veränderungen auf genetischer Ebene hinsichtlich ihrer Stabilität und Kristallisierbarkeit verbessert werden. Dazu sollte der Einfluss von Fusions- und Single-chain Proteinen auf die Thermostabilität untersucht werden. Außerdem sollten zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit und CLEC-Bildung PGA-Varianten mit reduzierter Oberflächenentropie hergestellt, charakterisiert und kristallisiert werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Menge einer schlecht sekretierten neuen rekombinanten PGA mit *B. megaterium* gesteigert werden. Die Menge an sekretiertem Protein ist abhängig von der Kombination aus Signalpeptid und Protein, allerdings kann der Sekretionserfolg nicht vorhergesagt werden. Deshalb sollte ein plasmidbasiertes Klonierungs- und Screeningsystem verwendet werden, um effiziente Signalpeptide für die Verbesserung der Sekretion einer weiteren heterologen PGA zu identifizieren, sodass die Menge groß genug sein sollte, um diese neue PGA ebenfalls abschließend zu reinigen und zu charakterisieren.

Zusammengefasst sollen neue thermostabile PGAs aus Gram-positiven Bakterien systematisch mit *state-of-the-art* Technologien modellhaft einer nachhaltigen industriellen Anwendung zugeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme, Kits und Materialien

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegelelektrophorese-kammer	Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad
Autoklaven	160 MLV V150	SHP Steriltechnik Systec
Bioreaktor	DASGIP Kultivierungssystem (Module: TC4SC4, MX4/4, PH4PO4 und CWD4)	DASGIP Information and Process Technology GmbH
Blauschirm	BL Star 16	Biometra
Blottinggerät	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
FPLC-System	ÄKTApurifier™ System - Module: P-900, UV-900, pH/C-900, INV-907, PV-908, Frac-900, M-925, CU-950 - Probenpumpe: P-950, - Software: Unicorn 5.31	Amersham pharmacia biotech
Geldokumentationsanlage	Gel iX20 Imager	INTAS Science Imaging
HPLC	- Merck-Hitachi LaChrom HPLC System: Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Diodenarray-Detektor L-7450, LaChrom Elite Säulenofen L- 2350 - Chromolith® HighResolution RP-18e HPLC Säule, 4.6 × 100 mm	Merck-Hitachi Merck
Inkubatoren	FUNCTION line BE200	Heraeus Memmert
Inkubationsschüttler	Ecotron Multitron Pro	Infors HT Infors HT
Mikrobioreaktor	BioLector®	m2p Labs
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Photometer	- NanoDrop® Spectrophotometer Nanodrop ND-1000 - NanoQuant infinite M200 pro - Libra S11	peQLab Biotechnologie GmbH TECAN Biochrom
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Reinstwassersystem	Milli-Q System	Merck Millipore
SDS-Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad

Gerät	Modell	Hersteller
Stromquelle	PowerPac™ Basic	Bio-Rad
Thermocycler	- PCR-Maschine: TPersonal - Real-Time-PCR-Maschine: CFX96 Real-Time PCR Detection System	Biometra Bio-Rad
Thermomixer	- MKR 10/13 - Thermomixer C - Thermomixer Comfort	HLC Eppendorf Eppendorf
Waagen	- CPA6202P - Excellence - Extend ED224S	Sartorius Sartorius Sartorius
Zentrifugen	- Avanti™ J-30I Centrifuge - Megafuge 1.0R, Rotor 2704 - Mini Spin - MicroStar 17R	Beckmann Coulter Heraeus Eppendorf VWR

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen wurden von New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) erworben und Kits zur Reinigung von DNA wurden von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Weitere benutzte Materialien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Materialien.

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
Anionenaustauschchromatographie-Säulenmaterial	Q-Sepharose	GE Healthcare
Blotmembran	Roti®-PVDF Transfermembran	Roth
Deckgläschen (silikonisiert)	18 mm circular cover slides – siliconized (Katalog Nr.: CSL-105)	Jena Bioscience
DNA-Fluoreszenzfarbstoff	Gel Star® Nucleic Acid Gel Stain	Lonza
DNA-Ladepuffer	6x Purple Loading Dye	New England Biolabs
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase	New England Biolabs
DNA-Marker	GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific™
DNA-Polymerase	Taq Phusion Q5	Biotherm New England Biolabs New England Biolabs
DNA-Reinigungskits	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up NucleoSpin Plasmid (No Lid) QIAEX II Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel Macherey-Nagel Qiagen
Farbstoff für Thermal Shift Assay	SYPRO™ Orange protein gel stain	Life Technologies

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
Filter	- Amicon Zentrifugalfilter - Filtropur BT50 0,2 500 mL Bottle Top Filter - Filtropur S 0,22 / 0,45	Merck Millipore Sarstedt Sarstedt
Gefärbter Proteinmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific™
Kationenaustauschchromatographie-Säule	5 mL HiTrap™ SP FF Säule	GE Healthcare
Kationenaustauschchromatographie-Säulenmaterial	SP-Sepharose	GE Healthcare
Mikrotestplatten	- 96-3 Well INTELLI-PLATE® - 96-Wells Mikroplatten - Boden flach - steril - 48-Well Flowerplates mit durchsichtigem Boden ohne Optoden - transparent 96-well plates (für Thermal Shift Assay)	Art Robbins Instruments Kisker Biotech m2p labs Microseal®, Bio-Rad
PCR Mastermix	Pfu Ultra II Hotstart Master Mix	Agilent Technologies
Präparative Gelfiltrationssäule	HiLoad™26/60 Superdex™75	GE Healthcare
Seed Bead™	HR-320 PTFE Seed Bead	Hampton Research
Umpufferungssäule	Nap-25-Säule	GE Healthcare
Ungefärbter Proteinmarker	Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific™

3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die Stämme *B. megaterium* MS941 und *B. subtilis* WB800N wurden während dieser Arbeit zur Proteinproduktion genutzt. Der *E. coli*-Stamm DH10B wurde zur Klonierung verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<i>B. megaterium</i> MS941	DSM319-Derivat; ΔnprM	(Wittchen and Meinhardt 1995)
<i>B. subtilis</i> WB800N	<i>nprE aprE epr bpr mpr::ble</i> <i>nprB::bsr Δvpr wprA::hyg</i> <i>cm::neo</i> ; NeoR	MoBiTec GmbH
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1</i> <i>endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697</i> <i>galU galK λ- rpsL(StrR) nupG</i>	Invitrogen™

Alle in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt und die genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 5 und 6 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete und erstellte Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
p3STOP1623hp	Shuttle-Vektor für die Klonierung in <i>E. coli</i> (Amp ^R) und rekombinante Genexpression in <i>B. megaterium</i> (Tet ^R), optimierter Xylose-induzierbarer Promotor, P _{xyIA} ^{opt} -mcs-3stop, oriU/repU (pBC16)	(Stammen et al. 2010)
pSP _{LipA} -hp	p3STOP1623hp-Derivat mit dem Signalpeptid der Lipase A aus <i>B. megaterium</i> , P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -mcs	(Stammen et al. 2010)
p3STOP1623hp-MCS-HIS (pTKSP0)	p3STOP1623hp-Derivat mit zusätzlicher MCS (KasI/MluI/AvrII/NotI/NheI/AgeI), HIS ₆ -Tag und Stopcodon	(Knuuti 2015)
Plasmide zur rekombinanten Produktion und Sekretion von PGAs		
pALBm1	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>B. megaterium</i> ATCC14945 (BmPGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{bmpga} -bmpga-stop	(Lakowitz et al. 2017)
pRBBm311	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>Bacillus thermotolerans</i> (BtPGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{btpga} -btpga-stop, kloniert mit BsrGI und BglII; artifizielles, für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertes Gen (GenBank MH142826)	(Mayer et al. 2019)
pRBBm314	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>Bacillus niacini</i> (BnPGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{bnpga} -bnpga-stop, kloniert mit BsrGI und BglII; artifizielles, für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertes Gen (GenBank MH142827)	(Mayer et al. 2019)
pRBBm315	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>Bacillus sp.</i> UNC438CL73TsuS30 (UNCPGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{uncpga} -uncpga-stop, kloniert mit BsrGI und BglII; artifizielles, für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertes Gen (GenBank MH142824)	(Mayer et al. 2019)
pRBBm316	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>Bacillus sp.</i> FJAT-27231 (FJAT-PGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{fjatpga} -fjatpga-stop, kloniert mit BsrGI und BglII; artifizielles, für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertes Gen (GenBank MH142822)	(Mayer et al. 2019)
pRBBm317	p3STOP1623hp-Derivat zur rekombinanten Produktion und Sekretion der PGA aus <i>Bacillus massiliogorillae</i> (BmasPGA), P _{xyIA} ^{opt} -sp _{bmaspga} -bmaspga-stop, kloniert mit BsrGI und BglII; artifizielles, für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertes Gen (GenBank MH142823)	(Mayer et al. 2019)
pJMBm39	p3STOP1623hp-Derivat mit artifiziellem für <i>B. megaterium</i> Codon-optimiertem Gen der PGA aus <i>E. coli</i> ATCC11105 (EcPGA) mit dem SP der BmPGA (GeneART 18ABYPMC) kloniert mit BsrGI und BglII; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{bmpga} -ecpga-stop	Diese Arbeit
Plasmide zur rekombinanten Produktion und Sekretion von Hybrid PGAs		
pJMBm7	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP 7; P _{xyIA} ^{opt} -fjatpga _{sp,α-UE, linker - btpga_{β-UE}-stop}	(Mayer et al. 2019)
pJMBm10	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP 10; P _{xyIA} ^{opt} -btpga _{sp,α-UE - fjatpga linker, β-UE-stop}	(Mayer et al. 2019)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pJMBm22	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion n der Hybrid-PGA HP 22; P_{xylA}^{opt} - <i>fjatpga</i> _{sp,α-UE} - <i>bmpga</i> _{linker, β-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm23	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP 23; P_{xylA}^{opt} - <i>bmpga</i> _{sp,α-UE} - <i>fjatpga</i> _{linker, β-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm41	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP _{EcFJAT} ; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{bmpga} - <i>ecpga</i> _{α-UE} - <i>fjatpga</i> _{linker, β-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm42	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP _{BmEC} ; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{bmpga} - <i>bmpga</i> _{α-UE} , <i>linker</i> - <i>ecpga</i> _{β-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm45	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Hybrid-PGA HP _{EcBt} ; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{bmpga} - <i>ecpga</i> _{α-UE} - <i>btpga</i> _{linker, β-UE} -stop	Diese Arbeit
Plasmide zur rekombinanten Produktion und Sekretion von Single-chain PGAs		
pJMBm1	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC1; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>fjatpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>fjatpga</i> _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm2	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion einer Single-chain BtPGA SCBt1; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>btpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>btpga</i> _{α-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm3	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion einer Single-chain BmPGA SCBm1; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>bmpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>bmpga</i> _{α-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm4	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC4 mit zusätzlichem Alanin hinter dem Signalpeptid; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>A</i> - <i>fjatpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>fjatpga</i> _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm5	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion einer Single-chain BtPGA SCBt2 mit zusätzlichem Alanin hinter dem Signalpeptid; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>A</i> - <i>btpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>btpga</i> _{α-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm6	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion einer Single-chain BmPGA SCBm2 mit zusätzlichem Alanin hinter dem Signalpeptid; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>A</i> - <i>bmpga</i> _{β-UE} - <i>GARD</i> - <i>bmpga</i> _{α-UE} -stop	Diese Arbeit
pJMBm25	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC25; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>fjatpga</i> _{β-UE} - <i>GARDG</i> - <i>fjatpga</i> _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm26	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC26; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>fjatpga</i> _{β-UE} - <i>GARDGA</i> - <i>fjatpga</i> _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm27	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC27; P_{xylA}^{opt} - <i>sp</i> _{lipA} - <i>fjatpga</i> _{β-UE} - <i>GARDGARD</i> - <i>fjatpga</i> _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pJMBm28	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC28 mit zusätzlichem Alanin hinter dem Signalpeptid; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -A-fjatpga _{β-UE} -GARDG-fjatpga _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm30	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC30 mit zusätzlichem Alanin hinter dem Signalpeptid; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -A-fjatpga _{β-UE} -GARDGARD-fjatpga _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm35	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC35, die Aminosäuren αK1, αD2, βR537 und βK538 neben dem Linker wurden entfernt; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -fjatpga _{β-UE} -GARD-fjatpga _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm37	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC37, die Aminosäuren αK1, αD2, αQ3, αK4, βN535, βA536, βR537 und βK538 neben dem Linker wurden entfernt; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -fjatpga _{β-UE} -GARD-fjatpga _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
pJMBm38	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der Single-chain FJAT-PGA SC38, die Aminosäuren αK1, αD2, αQ3, αK4, βN535, βA536, βR537 und βK538 neben dem Linker wurden entfernt; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} -fjatpga _{β-UE} -GARDGA-fjatpga _{α-UE} -stop	(Mayer et al. 2019)
Plasmide mit Punktmutationen in der aktiven Tasche der FJAT-PGA		
pJMBm85	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen zum Einfügen des Aminosäuretauschs βN245A	(Unger 2020)
QuikChange™ Mutagenese zur Verringerung der Oberflächenentropie (SER)		
pJMBm48	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen, Austausch der entsprechenden Codons gegen GCA, α K201A, K202A, E203A	(Wichmann 2020)
pJMBm49	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen, Austausch der entsprechenden Codons gegen GCA, β K403A, E404A, E405A	(Wichmann 2020)
pJMBm50	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen, Austausch der entsprechenden Codons gegen GCA, β K135A, E136A, K137A	(Wichmann 2020)
pJMBm51	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen, Austausch der entsprechenden Codons gegen GCA, α K201A, K202A, E203A, K403A, E404A, E405A	(Wichmann 2020)
pJMBm52	pRBBm316-Derivat, positionsspezifische Mutagenese im <i>fjatpga</i> -Gen, Austausch der entsprechenden Codons gegen GCA, α K201A, K202A, E203A, β K135A, E136A, K137A, K403A, E404A, E405A	(Wichmann 2020)
Plasmide zur Sekretion von PGAs mit alternativen Signalpeptiden		
pJMBm11	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der FJAT-PGA mit dem alternativem Signalpeptid der Protease Epr aus <i>B. subtilis</i> ; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{Epr} -fjatpga-stop, <i>fjatpga</i> -Gen ohne natives SP und über Primer angefügtes SP _{Epr} wurden mit BsrGI und EagI integriert	(Müller 2018)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pJMBm12	p3STOP1623hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der FJAT-PGA mit dem alternativem Signalpeptid von PhrK aus <i>B. subtilis</i> ; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{phrK} - <i>fjatpga-stop</i> , <i>fjatpga</i> -Gen ohne natives SP und über Primer angefügtes SP _{PhrK} wurden mit BsrGI und EagI integriert	(Müller 2018)
pJMBm17	pSP _{LipA} -hp-Derivat, zur rekombinanten Produktion und Sekretion der FJAT-PGA mit dem Signalpeptid der Lipase A aus <i>B. subtilis</i> ; P _{xyIA} ^{opt} -sp _{LipA} - <i>fjatpga-stop</i> , <i>fjatpga</i> ohne natives SP kloniert mit KasI und EagI	(Müller 2018)
Plasmide mit Mutationen im Signalpeptid des <i>fjatpga</i>-Gens durch Sättigungsmutagenese		
pJMBm58	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4L	Diese Arbeit
pJMBm59	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4A	Diese Arbeit
pJMBm60	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4P	Diese Arbeit
pJMBm61	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4F	Diese Arbeit
pJMBm62	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4Stop	Diese Arbeit
pJMBm63	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K4, Austausch von AAA gegen NNS, K4Stop	Diese Arbeit
pJMBm64	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position W5, Austausch von TGG gegen NNS, W5C	Diese Arbeit
pJMBm65	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K3, Austausch von AAA gegen NNS, K3A	Diese Arbeit
pJMBm66	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K3, Austausch von AAA gegen NNS, K3V	Diese Arbeit
pJMBm67	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position K3, Austausch von AAA gegen NNS, K3A	Diese Arbeit
pJMBm68	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position W5, Austausch von TGG gegen NNS, W5L	Diese Arbeit
pJMBm69	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position W5, Austausch von TGG gegen NNS, W5C	Diese Arbeit
pJMBm70	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>fjatpga</i> Gens an Position W5, Austausch von TGG gegen NNS, W5M	Diese Arbeit

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pJMBm71	pRBBm316-Derivat, entstanden durch Sättigungsmutagenese im SP des <i>ffatpga</i> Gens an Position W5, Austausch von TGG gegen NNS, W5T	Diese Arbeit
Plasmide für das Multisignalpeptidscreening		
pJMBm75	p3STOP1623hp-MCS-HIS-Derivat, <i>bmaspga</i> Gen ohne SP mit NheI und NgoMIV eingefügt; P_{xyIA}^{opt} - <i>mcs-bmaspga-histag-stop</i>	(Bischoff 2019)
pJMBm84	pJMBm75-Derivat, BmasPGA-Klon F8 aus Multisignalpeptid-Screening nach zufälligem Einbau der SPs von pMSPBm3 in pJMBm75, SP von ADF37267.1: Extracellular ribonuclease; P_{xyIA}^{opt} - <i>sp</i> _{ADF37267.1} - <i>bmaspga-histag-stop</i>	Diese Arbeit
pMSPBm3	pUC57-Derivat, 18 für Signalpeptide aus <i>B. megaterium</i> DSM319 codierende DNA-Sequenzen, getrennt von BsrGI- und NgoMIV-Schnittstellen, Carb ^R , ori pBR322	(Baumgarten 2019)
pMSPBm4	pUC57-Derivat, 18 für Signalpeptide aus <i>B. megaterium</i> DSM319 codierende DNA-Sequenzen, getrennt von BsrGI- und NgoMIV-Schnittstellen, Carb ^R , ori pBR322	(Baumgarten 2019)
pMSPBm5	pUC57-Derivat, 18 für Signalpeptide aus <i>B. megaterium</i> DSM319 codierende DNA-Sequenzen, getrennt von BsrGI- und NgoMIV-Schnittstellen, Carb ^R , ori pBR322	(Baumgarten 2019)

Tabelle 5: Oligonukleotide als Sequenzierprimer und Primer für die Kolonie-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
SeqpXyIA_fw	AAGTTGGTGTTCCTTGA	Zur Sequenzierung aller p3STOP1623hp-Derivate und für Kolonie-PCR
SeqpMM1520_rv	GTTTGCGCATTACAGTTCTCC	Zur Sequenzierung aller p3STOP1623hp-Derivate und für Kolonie-PCR
SeqP_Xho1_fw	CCGACTAGACCATAAGGG	Für Kolonie-PCR
RB295fw	GCTTACCGCTTAAATTGG	Zur Sequenzierung des <i>btpga</i> -Gens
RB297fw	GCGAAGAATTAGGACTTCC	Zur Sequenzierung des <i>bnpga</i> -Gens
RB298fw	CTCACGAATTAGGCATTCC	Zur Sequenzierung des <i>uncpga</i> -Gens
RB299fw	GATTACCTCTTAAATTG	Zur Sequenzierung des <i>ffatpga</i> -Gens
RB300fw	GCAACGCTGTAATTATTGG	Zur Sequenzierung des <i>bmaspga</i> -Gens
JMEc1_fw	GCTGATGGTGCTTTATTAGC	Zur Sequenzierung des <i>ecpga</i> -Gens
JM_seq_FJAT_fw	CGGCGTATGTAAATGAAGC	Zur Sequenzierung des <i>ffatpga</i> -Gens

Tabelle 6: Weitere verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
Konstruktion von Hybrid-PGAs		
JMHP_AB01_fw	ATCATGTACAATGAAAAAAAAATGGTTAATG	pJMBm7 und 22
JMHP_A02_rv	CCCACAATCATAGCATTGCTGCCAATTTTAAGAGGTAATC	pJMBm7
JMHP_A03_fw	GATTACCTCTTAAATTGGCAGCAATGCTATGATTGTGGG	pJMBm7
JMHP_AB04_rv	ATCACGGCCGTTATTCAGATACGTTTAAATC	pJMBm7 und 45
JMHP_CD01_fw	ATCATGTACAATGATGGAAAAACAAAATG	pJMBm10
JMHP_D02_rv	GAAGCATCAATTACAGCAGAGCTTAAAGGTTGTAAGC	pJMBm10
JMHP_D03_fw	GCAGTACAACCTTTAAGCTCTGCTGTAATTGATGCTTC	pJMBm10

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
JMHP_CD04_rv	ATCACGGCCGTTATTTACGAGCATTAAATTC	pJMBm10, 23 und 41
JMHP_F02_rv	GAAGCTTTGATTACAGCTGAAGAAAAAGGTTGAATAGATG	pJMBm22
JMHP_F03_fw	CATCTATTCAACCTTTTTCTTCAGCTGTAATCAAAGCTTC	pJMBm22
JMHP_Bm_rv	ATCACGGCCGCTACTTACTCATATTTAATGCGC	pJMBm22
JMHP_GH01_fw	ATCATGTACAATGAAGACGAAGTGGCTAATATC	pJMBm23, 41, 42 und 45
JMHP_G02_rv	CCAATAATCATAGCATTAGAGCCTATCTTTAACGGTAATC	pJMBm23
JMHP_G03_fw	GATTACCGTTAAAGATAGGCTCTAATGCTATGATTATTGG	pJMBm23
JMHP_Ec_rv	ATCACGGCCGTTAACGTTGTACGTGTAACAC	pJMBm42
JMHP_EcFJ_rv	GAAGCATCAATTACAGCAGAAGCCGTTTGGCTATTTTG	pJMBm41
JMHP_EcFJ_fw	CAAAATAGCCAAACGGCTTCTGCTGTAATTGATGCTTC	pJMBm41
JMHP_BmEc_rv	CCAATTACCCACATGTTAGAGCCTATCTTTAACGGTAATC	pJMBm42
JMHP_BmEc_fw	GATTACCGTTAAAGATAGGCTCTAACATGTGGGTAATTGG	pJMBm42
JMHP_EcBt_rv	GAAGCATTAATTACAGCGCTAGCCGTTTGGCTATTTTG	pJMBm45
JMHP_EcBt_fw	CAAAATAGCCAAACGGCTAGCGCTGTAATTAATGCTTC	pJMBm45
Konstruktion von Single-chain PGAs		
JMFJ01_fw	GAATTTAATGCTCGTAAAGGAGCTAGAGATAAAGATCAAAAAAGTAG	pJMBm1 und 4
JMFJ01a_fw	GAATTTAATGCTCGTAAAGGAGCTAGAGATGGAAAAGATCAAAAAAAGTAG	pJMBm25
JMFJ01b_fw	GAATTTAATGCTCGTAAAGGAGCTAGAGATGGAGCTAAAGATCAAAAAAAGTAG	pJMBm26
JMFJ01c_fw	GAATTTAATGCTCGTAAAGGAGCTAGAGATGGAGCTAGAGATAAAGATCAAAAAAAGTAG	pJMBm27 und 30
JMFJ01_fw_k	GTATCTGAATTTAATGCTGGAGCTAGAGATCAAAAAAAGTAGAAAATG	pJMBm35
JMFJ01_fw_k2	GTATCTGTATCTGAATTTGGAGCTAGAGATAAAGTAGAAATGTAAACAA	pJMBm37
JMFJ01b_fw_k2	GTATCTGTATCTGAATTTGGAGCTAGAGATGGAGCTAAAGTAGAAAATGTAAACAA	pJMBm38
JMFJ02_rv	TATCACGGCCGTTAAGAAAAAGGTTGAATAGATG	pJMBm1, 4, 25, 26, 27, 30, 35, 37 und 38
JMFJ03_fw	TGATAGGCGCCGCATCTAATGCTATGATTATTGG	pJMBm4, 28 und 30
JMFJ04_rv	CTACTTTTTTTTGATCTTTATCTCTAGCTCCTTTACGAGCATTAAATTC	pJMBm1 und 4
JMFJ04a_rv	CTACTTTTTTTTGATCTTTTCCATCTCTAGCTCCTTTACGAGCATTAAATTC	pJMBm25 und 28
JMFJ04b_rv	CTACTTTTTTTTGATCTTTAGCTCCATCTCTAGCTCCTTTACGAGCATTAAATTC	pJMBm26

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
JMFJ04c_rv	CTACTTTTTTTTGATCTTTATCTCTAGCTCCATCTCTAGCTC CTTTACGAGCATTAATTC	pJMBm27 und 30
JMFJ04_rv_k	CATTTTCTACTTTTTTTTGATCTCTAGCTCCAGCATTAAATT CAGATAC	pJMBm35
JMFJ04_rv_k2	TTGTTACATTTTCTACTTTATCTCTAGCTCCAAATTCAGAT ACAGATAC	pJMBm37
JMFJ04b_rv_k2	TTGTTACATTTTCTACTTTAGCTCCATCTCTAGCTCCAAAT TCAGATACAGATAC	pJMBm38
JMFJ05_fw	TGATAGGCGCCTCTAATGCTATGATTATTGG	pJMBm1, 25, 26, 27, 35, 37 und 38
JMBt01_fw	CGGATTTAAACGTATCTGAAGGAGCTAGAGATAAAGGAT ATGAAAAAGCTGG	pJMBm2 und 5
JMBt02_rv	TATCACGGCCGTTAGCTTAAAGGTTGTACTGC	pJMBm2 und 5
JMBt03_fw	TGATAGGCGCCGCAAGCAATGCTATGATTGTGGG	pJMBm5
JMBt04_rv	CCAGCTTTTTCATATCCTTTATCTCTAGCTCCTTCAGATAC GTTTAAATCCG	pJMBm2 und 5
JMBt05_fw	TGATAGGCGCCAGCAATGCTATGATTGTGGG	pJMBm2
JMBm01_fw	CGCATTAATATGAGTAAGGGAGCTAGAGATGGGGAGG ATAAGAATGAAG	pJMBm3 und 6
JMBm02_rv	TATCACGGCCGTTAAGACAGTATTTGAAGGGATTG	pJMBm3 und 6
JMBm03_fw	TGATAGGCGCCGCAAGTAATGCCGCCATAGTCG	pJMBm5
JMBm04_rv	CTTCATTCTTATCCTCCCATCTCTAGCTCCCTTACTCATAT TTAATGCG	pJMBm3 und 6
JMBm05_fw	TGATAGGCGCCAGTAATGCCGCCATAGTCG	pJMBm3
Punktmutationen im aktiven Zentrum der FJAT-PGA		
JM_FJB_N245A_1fw	GGCTATGTAGTTAATTGGGCTAACAAACCTAGC	pJMBm85
JM_FJB_N245A_1rv	GCTAGGTTTGTTAGCCCAATTAACATACATAGCC	pJMBm85
QuikChange™ Mutagenese zur Verringerung der Oberflächenentropie (SER)		
JMserFJAT201fw	CTGATGATCAAACGGATATTGCAGCAGCAGGTAACAT CTATTCAACC	pJMBm48, 51 und 52
JMserFJAT201rv	GGTTGAATAGATGTTTTACCTGCTGCTGCAATATCCGTTT GATCATCAG	pJMBm48, 51 und 52
JMserFJAT615fw	CGAACTATCAGTGGAATCTGCAGCAGCAGCAGAAAAA ATTATTTTAG	pJMBm52
JMserFJAT615rv	CTAAAATAATTTTTCTGCTGCTGCTGCAGATTTCCACTGA TAGTTCG	pJMBm52
JMserFJAT347fw	GACCTGTAATTTCTTTAGATGCAGCAGCAAATGTAGCTTA TTCTAAATC	pJMBm50 und 52
JMserFJAT347rv	GATTTAGAATAAGCTACATTTGCTGCTGCATCTAAAGAAA TTACAGGTC	pJMBm50 und 52
Konstruktion von Expressionsvektoren für das Multisignalpeptidscreening		
JMSPBmas_fw	TGATCTGCCGGCCAAATAACAGCGGAGTGAAAG	pJMBm75
JMSPBmas_rv	TGATCTGCTAGCTTATTTTTTTTCGTTTTCTTTGTTAAATG	pJMBm75

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
Test alternativer Signalpeptide		
JMFJEpr_fw	ATCATGTACAATGAAAAACATGTCTTGCAAACCTGTTGTA TCAGTCACTCTGTTTTTCAGTTTTCTCACCATAGGCCCTCT CGCTCATGCGAAAGATCAAAAAAAGTAG	pJMBm11
JMFJPhrK_fw	ATCATGTACAATGAAAAAAGTTGTGCTTTGCGTATCTATT TTAGCTGTGATTTTAAGTGGAGTAGCTAAAGATCAAAAA AAAGTAG	pJMBm12
JMHP_CD04_rv	ATCACGGCCGTTATTTACGAGCATTAAATTC	pJMBm11, 12 und 17
JMBtEpr_fw	ATCATGTACAATGAAAAACATGTCTTGCAAACCTGTTGTA TCAGTCACTCTGTTTTTCAGTTTTCTCACCATAGGCCCTCT CGCTCATGCGAAAGGATATGAAAAAGCTGG	pJMBm13
JMBtPhrK_fw	ATCATGTACAATGAAAAAAGTTGTGCTTTGCGTATCTATT TTAGCTGTGATTTTAAGTGGAGTAGCTAAAGGATATGAA AAAGCTGG	pJMBm14
JMHP_AB04_rv	ATCACGGCCGTTATTCAGATACGTTTAAATC	pJMBm13, 14 und 18
JMSCFEpr_fw	ATCATGTACAATGAAAAACATGTCTTGCAAACCTGTTGTA TCAGTCACTCTGTTTTTCAGTTTTCTCACCATAGGCCCTCT CGCTCATGCGTCTAATGCTATGATTATTGG	pJMBm15
JMSCFEpr_rv	ATCACGGCCGTTAAGAAAAAGGTTGAATAG	pJMBm15 und 16
JMSCFJPhrK_fw	ATCATGTACAATGAAAAAAGTTGTGCTTTGCGTATCTATT TTAGCTGTGATTTTAAGTGGAGTAGCTTCTAATGCTATGA TTATTGG	pJMBm16
JMFJLip_fw	ATCAGGCGCCAAAGATCAAAAAAAGTAG	pJMBm17
JMBtLip_fw	ATCAGGCGCCAAAGGATATGAAAAAGCTGG	pJMBm18
Sättigungsmutagenese im Signalpeptid des <i>jjatpga</i>-Gens		
K3NNS_fw	GTGAATGTACAATGAAANNNSAAATGGTTAATGGTAATTA TG	pJMBm65 und 66
K3NNS_rv	CATAATTACCATTAACCATTTSNNTTTCATTGTACATTCAC	pJMBm65 und 66
K4NNS_fw	GAATGTACAATGAAAAAANNSTGGTTAATGGTAATTATG	pJMBm58, 59, 60, 61, 62, 63 und 67
K4NNS_rv	CATAATTACCATTAACCASNNTTTTTTTCATTGTACATTC	pJMBm58, 59, 60, 61, 62, 63 und 67
W5NNS_fw	GTACAATGAAAAAANNSTTAATGGTAATTATGATG	pJMBm64, 68, 69, 70 und 71
W5NNS_rv	CATCATAATTACCATTAASNNTTTTTTTTTTCATTGTAC	pJMBm64, 68, 69, 70 und 71

3.3 Plasmidkonstruktion

Zur Identifikation potentieller neuer Penicillin G Acylasen (PGAs) wurde eine ProteinBLAST-Analyse (NCBI) mit der Aminosäuresequenz der PGA von *B. megaterium* ATCC14945 (BmPGA) durchgeführt. Nach der Auswahl von fünf hypothetischen PGAs wurden die dazugehörigen DNA-Sequenzen mit einer

optimierten Codonverwendung (Codon Usage) für *B. megaterium* (Grote et al. 2005) und den Restriktionsschnittstellen BsrGI am 5'-Ende und BglII am 3'-Ende von Life Technologies (Carlsbad, USA) synthetisiert. Die verschiedenen *pga*-Gene wurden mithilfe der Restriktionsschnittstellen in den Shuttle-Vektor p3STOP1623hp (Stammen et al. 2010) ligiert. Daraus entstanden die Plasmide pRBBm311 mit dem *btpga*-Gen (GenBank accession number MH142826), welches für die PGA aus *Bacillus thermotolerans* (BtPGA) codiert, pRBBm314 mit dem *bnpga*-Gen (MH142827), welches für die PGA aus *Bacillus niacini* (BnPGA) codiert, pRBBm315 mit dem *uncpga*-Gen (MH142824), welches für die PGA aus *Bacillus sp.* UNC438CL73TsuS30 (UNC-PGA) codiert, pRBBm316 mit dem *ffatpga*-Gen (MH142822), welches für die PGA aus *Bacillus sp.* FJAT-27231 (FJAT-PGA) codiert, und pRBBm317 mit dem *bmaspga* Gen (MH142823), welches für die PGA aus *Bacillus massiliogorillae* (BmasPGA) codiert. Hybrid-PGAs wurden durch die Kombination zweier PGA-Untereinheiten von FJAT-PGA, BtPGA, BmPGA und EcPGA hergestellt. Die Untereinheiten wurden einzeln durch PCR von entsprechenden Plasmiden amplifiziert. Das Signalpeptid stammte dabei immer von gleichen PGA wie die α -Untereinheit. Die zur Amplifikation eingesetzten Primer wiesen jeweils komplementäre Überlappungen auf, sodass die Untereinheiten dadurch hybridisiert werden konnten. Die verbundenen Fragmente wurden in einem zweiten PCR-Schritt vervielfältigt und, nach Verdau mit BsrGI und EagI, in den Shuttle-Vektor p3STOP1623hp integriert (Stammen et al. 2010).

Single-chain PGAs wurden mithilfe von Primern mit überlappenden Enden konstruiert. Die benötigten Untereinheiten wurden einzeln und ohne Signalpeptid durch PCR amplifiziert. Die Untereinheiten wurden in umgekehrter Reihenfolge durch einen kurzen Linker mit einer Länge von vier bis acht Aminosäuren, welcher durch den Primer eingebracht wurde (Tabelle 6), verknüpft, sodass die β -Untereinheit N-terminal zur α -Untereinheit, wie bei der Single-chain EcPGA von Flores et al. (Flores et al. 2004), lag. Durch Integration in den Shuttle-Vektor pSLipA-hp (Stammen et al. 2010) mithilfe der Schnittstellen KasI und EagI wurde das Signalpeptid der Lipase A aus *B. megaterium* für den Export über den Sec-Pathway angefügt. Bei einigen Single-chain PGAs wurde zwischen Signalpeptid und die β -Untereinheit ein zusätzliches Alanin eingefügt, um für eine bessere Prozessierung basierend auf der Voraussage des Tools SignalP (Petersen et al. 2011) zu sorgen.

Der Expressionsvektor für das Signalpeptid-Screening wurde basierend auf dem Vektor p3STOP1623hp-MCS-HIS (Knuuti 2015), einem p3STOP1623hp-Derivat mit zusätzlicher multipler Klonierungsstelle und zusätzlichem His-Tag, hergestellt. Das *pga*-Gen aus *B. massiliogorillae* wurde ohne natives Signalpeptid über die Restriktionsschnittstellen NgoMIV und NheI eingefügt, wodurch das Plasmid pJMBm75 entstand. Signalpeptide aus den Multisignalpeptidplasmiden pMSPBm3 bis 5 konnten über die Restriktionsschnittstellen BsrGI und NgoMIV eingefügt werden.

Punktmutationen wurden mithilfe der QuikChangeTM Methode in *pga*-Gene eingefügt. Dazu wurden komplementäre Primer entworfen, die jeweils die gewünschte Mutation innerhalb bindender Sequenzen enthielten. Das gesamte Plasmid wurde mithilfe dieser Primer amplifiziert und somit die Mutation an der gewünschten Stelle im Gen erhalten. Das methylierte Ausgangsplasmid ohne die Mutation wurde durch das Enzym DpnI verdaut.

Die Plasmidkonstruktion aller Plasmide wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

3.4 Kulturmedien und Zusätze

Die in Tabelle 7 aufgeführten Medien wurden in dieser Arbeit zur Kultivierung verwendet.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Medien und ihre Zusammensetzung.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl Für Festmedien zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar-Agar
2xYT Medium	1,6 % (w/v) Trypton 1,0 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl

In Tabelle 8 sind die verwendeten Medienzusätze aufgelistet. Diese wurden als Stammlösung hergestellt und sterilfiltriert.

Tabelle 8: Verwendete Medienzusätze.

Medienzusatz	Bakterienstamm	Stammlösung	Endkonzentration
CaCl ₂	<i>B. megaterium</i>	1 M in ddH ₂ O	2,5 mM
Carbenicillin	<i>E. coli</i>	100 g/L in ddH ₂ O	100 mg/L
Tetracyclin	<i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i>	5 g/L in 70 % (v/v) Ethanol	10 mg/L
Xylose	<i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i>	50 % (w/v)	0,5 % (w/v)

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Medien, Puffer und Geräte wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min dampfsterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen und Kulturüberstände wurden über einen Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser sterilfiltriert.

3.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien auf Festmedium wurde etwas Zellmaterial aus einer Überdauerungs-Glycerinkultur auf LB-Agar-Platten, gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

E. coli Zellen wurden in LB-Medium bei Bedarf mit Carbenicillin und *B. megaterium* bzw. *B. subtilis* Zellen wurden in LB-Medium bei Bedarf mit Tetracyclin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Für die Kultivierung von *B. megaterium* bzw. *B. subtilis* wurden Vorkulturen aus 50 mL LB-Medium (ggf. mit Tetracyclin) über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert und mit diesen Vorkulturen dann weitere Kulturen im Verhältnis 1:50 inokuliert. Die Antibiotika wurden nach der Sterilisation der Medien zugegeben, wenn diese entsprechend abgekühlt waren.

Kurzfristig gelagert wurden Bakterien auf LB-Agar-Platten bei 4 °C. Die längerfristige Lagerung erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Dazu wurde eine Bakteriensuspension im Verhältnis 1:3 mit 86%igem sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung und Transformation *CaCl₂*-kompetenter *Escherichia coli* DH10B Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH10B Zellen wurden zuerst 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie der *E. coli* DH10B Zellen beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 mL LB-Medium im 500 mL Schikanekolben mit 1 mL dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Kultur wurde in zwei Zentrifugenröhrchen überführt, für 10 min auf Eis gelagert und dann 10 min bei 4 °C und 3345 g zentrifugiert. Nach kompletter Abnahme des Überstandes wurde jedes Zellsediment vorsichtig in 10 mL eiskalter 100 mM *CaCl₂*-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach Lagerung der Zentrifugenröhrchen für 15 min auf Eis, wurden diese erneut für 10 min bei 4 °C und 3345 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die sedimentierten Zellen in 1 mL eiskalter 100 mM *CaCl₂*-Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Zur Transformation wurden 1 µL Plasmid-DNA oder 5 µL Ligationsansatz bzw. 5 µL Plasmid-DNA nach QuikChange™ Mutagenese vorsichtig mit 50 µL kompetenten Zellen gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis, wurden 250 µL LB-Medium zugegeben und dieser Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agar-Platten mit Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.6.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Transformationen oder Sequenzierung wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel gemäß den Herstellerangaben verwendet (Protokoll 5.1: „Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*“). Abweichend wurde mit 70 °C heißem ddH₂O eluiert, welches zuvor 10 min bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert worden war.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* für einen Testverdau wurden 6 mL LB_{carb}-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (17000 g, 2 min) und das Zellsediment wurde vollständig in 300 µL P1 (Tabelle 9) resuspendiert. Danach wurden 300 µL P2 zugesetzt, durch Invertieren vorsichtig gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 300 µL P3 entstand ein unlöslicher Proteinniederschlag, welcher durch Zentrifugation (17000 g, 15 min) abgetrennt wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren. Nach guter Durchmischung wurde erneut 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 400 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach

Zentrifugation (17000 g, 5 min), wurde die DNA bei 70 °C im Thermomixer getrocknet und in 50 µL ddH₂O gelöst.

Tabelle 9: Lösungen und ihre Zusammensetzung für die Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli.

Lösung	Zusammensetzung
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A
Puffer P2 (Alkalischer Lysepuffer)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Äquilibrierungspuffer)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

3.6.3 Herstellung und Transformation von *Bacillus megaterium* MS941 Protoplasten

Zur Herstellung kompetenter *B. megaterium* MS941 Protoplasten wurde zunächst 50 mL LB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur dieses Stammes inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3345 g, 4 °C, 15 min), das Zellsediment in 5 mL frisch hergestelltem SMMP (Tabelle 10) resuspendiert und die Suspension in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µL Lysozymlösung wurde die Protoplastierung induziert und das Fortschreiten dieser unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde bei 37 °C und 50 rpm inkubiert bis etwa 80 % der Zellen als Protoplasten vorlagen. Die Protoplasten wurden anschließend zentrifugiert (1300 g, Raumtemperatur, 10 min), der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellsediment in 5 mL SMMP resuspendiert. Nach Wiederholung der letzten drei Schritte wurden die Protoplasten mit 750 µL 86%igem Glycerin gemischt, zu je 500 µL aliquotiert, über Nacht auf Eis im Kühlschrank gelagert und dann bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurden 500 µL auf Eis aufgetaute Protoplasten zu 10 µL Plasmid-DNA mit einer Konzentration zwischen 100 und 200 ng/µL gegeben und diese Suspension in 1,5 mL PEG-P (Tabelle 10) pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen und 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 mL frisches SMMP zugegeben, erneut vorsichtig gemischt und zentrifugiert (1300 g, Raumtemperatur, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 500 µL SMMP resuspendiert. Es wurde für 45 min bei 30 °C ohne Schütteln und anschließend für 45 min bei 30 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde zum vorbereiteten CR5-Topagar gegeben, wobei Lösung B erst kurz davor aufgekocht und zugegeben wurde, und auf einer LB-Agarplatte mit 10 mg/L Tetracyclin verteilt. Es wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert und einzelne gewachsene Kolonien erneut auf LB-Medium mit Tetracyclin ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. In Tabelle 10 sind alle zur Herstellung und Transformation der Protoplasten benötigten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 10: Lösungen für die Herstellung und Transformation von Protoplasten.

Lösung	Zusammensetzung und Sterilisationsmethode
2x AB3 (Antibiotic Medium No. 3)	35 g/L AB3 (von Difco) Autoklavieren
2x SMM	40 mM Maleinsäure 80 mM NaOH 40 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1 M Saccharose Sterilfiltrieren
SMMP	50 % (v/v) 2x AB3 50 % (v/v) 2x SMM
Lysozymlösung	1 mg/mL Lysozym in SMMP Sterilfiltrieren
PEG-P	40 % (w/v) PEG 6000 in 1x SMM Autoklavieren
Lösung A	602 mM Saccharose 58 mM MOPS 30 mM NaOH Sterilfiltrieren
Lösung B	14,04 g/L Agar 700 mg/L Casaminoäuren 35,09 g/L Hefeextrakt Autoklavieren
8x CR5-Salze	11,5 mM K_2SO_4 393,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 2,9 mM KH_2PO_4 158,6 mM CaCl_2 Sterilfiltrieren
CR5-Topagar (für eine Transformation)	1,25 mL Lösung A 713 μL Lösung B 288 μL 8x CR%-Salze 125 μL 12 % (w/v) Prolin 125 μL 20 % (w/v) Glucose

3.6.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *Bacillus megaterium*

Zunächst wurden 50 mL LB_{Tet} -Medium mit dem entsprechenden *B. megaterium* Plasmidstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 90 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation (3345 g, 4 °C, 15 min) wurden 10 bis 15 mL Zellen geerntet und das Zellsediment eingefroren. Das Zellsediment wurde in 200 μL bis 1 mL SET-Puffer (Tabelle 11) resuspendiert, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer inkubiert. Dann wurde 350 μL P2 zugegeben, durch Invertieren gemischt und maximal 5 min inkubiert bis die Lösung klar wurde. Nach Zugabe und Vermischung mit 350 μL P3 wurde der sichtbare Proteinniederschlag durch Zentrifugation abgetrennt (11000 g, 15 min). Anschließend wurden 650 μL der unteren Phase eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs mit 750 μL Überstand gut gemischt und dann zentrifugiert (11000 g, 15 min).

Die obere Phase wurde in einem weiteren Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 400 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (11000 g, 5 min) wurde die DNA bei 70 °C im Thermomixer getrocknet und in 15 bis 30 µL ddH₂O gelöst.

Tabelle 11: Lösungen und ihre Zusammensetzung für die Präparation von Plasmid-DNA aus *B. megaterium*.

Lösung	Zusammensetzung
SET-Puffer	25 % (w/v) Saccharose 50 mM EDTA pH 8 50 mM Tris-HCl pH 8 100 µg/mL RNase 14 mg/mL Lysozym
Puffer P2 (Alkalischer Lysepuffer)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Äquilibrierungspuffer)	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

3.6.5 Herstellung und Transformation von *Bacillus subtilis*

Als Vorkultur wurden 10 mL Kompetenzmedium (Tabelle 12) in einem 100 mL Schikanekolben mit *B. subtilis* WB800N inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Danach wurden 10 mL Kompetenzmedium mit 600 µL der Vorkultur beimpft und für 3 h bei 230 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 10 mL Starvation-Medium wurde für weitere 2 h inkubiert. Die entstandenen kompetenten Zellen wurden in 400 µL Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde 10 µL gereinigte DNA mit 400 µL der kompetenten *B. subtilis* WB800N Zellen gemischt, für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert und auf LB_{Tet}-Agrarplatten ausgestrichen, die über Nacht bei 37 °C kultiviert wurden.

Tabelle 12: Medien für die Herstellung und Transformation von kompetenten *B. subtilis* Zellen.

Medium	Zusammensetzung
Spizizen Minimalmedium (Smm)	15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 80 mM K ₂ HPO ₄ 44 mM KH ₂ PO ₄ 3 mM Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O 811 µM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Kompetenzmedium	0,5 % Glucose 6 mM MgSO ₄ 490 µM L-Tryptophan 0,02 % Casaminoacids 420 nM Ammonium-Eisen(III)-Citrat in Smm
Starvation-Medium	0,5 % Glucose 6 mM MgSO ₄ in Smm

3.6.6 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm mithilfe des Nanodrops ND-1000 (peQLab, Erlangen, Deutschland).

3.6.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA in sich wiederholenden Reaktionsschritten. Dazu wird zunächst der Doppelstrang der Template-DNA durch Hitze denaturiert. Im zweiten Schritt (Hybridisierung) lagern sich an diesen DNA-Einzelstrang sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) an, von denen im dritten Schritt die Elongation beginnt. In dieser Phase synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang (Mullis et al. 1986).

In dieser Arbeit wurden die Q5- und die Phusion-Polymerase zur Erstellung von Plasmiden verwendet. Die entworfenen Oligonukleotide sind in Tabelle 6 dargestellt. Mithilfe dieser Primer konnten Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen, Linker zwischen Untereinheiten oder ganze Signalpeptide eingefügt werden. Für die PCR wurden verschiedene Polymerasen und Ansätze (Tabelle 13) sowie PCR-Programme (Tabelle 14) verwendet.

Tabelle 13: PCR-Ansätze für Phusion- und Q5-Polymerase.

Phusion		Q5	
Komponenten	Volumen [μL]	Komponenten	Volumen [μL]
5x Phusion HF	4	5x Q5 Reaktionspuffer	5
10 mM dNTPs	0,4	10 mM dNTPs	0,5
10 μM Forward Primer	1	10 μM Forward Primer	1,25
10 μM Reverse Primer	1	10 μM Reverse Primer	1,25
DNA-Template 1	1	Template DNA 1	1,25
(DNA-Template 2)	1	(Template DNA 2)	1,25
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,2	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
ddH ₂ O	ad 20	ddH ₂ O	ad 25

Tabelle 14: Reaktionsschema der PCR mit Phusion- und Q5-Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	30
Hybridisierung	52 - 60	30	
Elongation	72	30 pro kb	
Finale Elongation	72	300 (Phusion) 120 (Q5)	1

3.6.8 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um Signalpeptid-DNA-Sequenzen in *B. megaterium* Klonen, die in Screenings eingesetzt wurden, durch anschließende Sequenzierung zu identifizieren. Es wurde keine gereinigte DNA als Vorlage genutzt, sondern direkt aus Kolonien gewonnene DNA. Dazu wurde eine

Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte entnommen und 20 µL Aufschlusspuffer (150 mM Tris-HCl pH 8, 1mg/mL Lysozym und 100 µg/mL Proteinase K) zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Dazu wurde zunächst für 20 min bei 37 °C und 400 rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend für weitere 20 min bei 55 °C und 400 rpm. Die Proben wurden nach Hitzeinaktivierung bei 95 °C zentrifugiert (17000 g, 10 min). Der Überstand wurde für die PCR als Template-DNA genutzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das Protokoll sind in Tabelle 15 und 16 dargestellt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente gereinigt und sequenziert.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines Kolonie-PCR-Ansatzes.

Komponenten	Volumen [µL]
10x Thermopol Reaktionspuffer	5
10 mM dNTPs	1
10 µM Forward Primer SeqpXylA_fw	1
10 µM Reverse Primer SeqpMM1520_rv	1
Template DNA (aus Kolonie)	5
Taq Polymerase	0,25
ddH ₂ O	ad 50

Tabelle 16: Ablauf der Kolonie-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1
Denaturierung	95	30	30
Hybridisierung	55	60	
Elongation	68	60 pro kb	
Finale Elongation	68	600	1

3.6.9 Positionsspezifische Mutagenese mit der QuikChange™ Methode

Mithilfe der QuikChange™ Methode können Punktmutationen in eine Ziel-DNA-Sequenz eingefügt werden. Dazu werden jeweils zwei komplementäre, die Mutation enthaltende Primer verwendet und das gesamte Plasmid amplifiziert. Tabelle 17 zeigt die Zusammensetzung und Tabelle 18 den Ablauf der PCR. Das ursprüngliche, methylierte Plasmid wurde durch DpnI verdaut. Dazu wurde 1 µL DpnI zugegeben, der gesamte Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch 20-minütige Inkubation bei 80 °C gestoppt. Anschließend wurden *E. coli* DH10B Zellen mit dem veränderten Plasmid transformiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung für die positionsspezifische Mutagenese nach der QuikChange™ Methode.

Komponenten	Volumen [µL]
Pfu Ultra II Hotstart Master Mix (2x)	25
10 µM Forward Primer	2,5
10 µM Reverse Primer	2,5
Template DNA	1
ddH ₂ O	ad 50

Tabelle 18: Ablauf der PCR nach der QuikChange™ Methode.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1
Denaturierung	95	30	18
Hybridisierung	55	60	
Elongation	68	60 pro kb	
Finale Elongation	72	300	1

3.6.10 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die nach der PCR erhaltenen Amplifikate wurde mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Elution wurde vorgewärmtes ddH₂O verwendet, welches 10 min auf der Membran inkubiert wurde.

3.6.11 Restriktionsverdau

DNA kann von Restriktionsendonukleasen anhand palindromischer Erkennungssequenzen sequenzspezifisch geschnitten werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) mit den entsprechenden Restriktionspuffern verwendet und die Bedingungen nach Herstellerangaben gewählt. Für Klonierungen wurden PCR-Fragmente und Zielvektoren in Ansätzen von 30 bis 40 µL für 16 h verdaut und anschließend aus einem Agarosegel gereinigt. Beim Verdau der Multisignalpeptidplasmide (pMSPs) wurden 20 µL Ansätze ebenfalls für 16 h verdaut und anschließend aus einem Agarosegel gereinigt. Zur Überprüfung der Klonierung wurden fertige Plasmide in einem Testverdau-Ansatz von 10 µL für 1 bis 2 h geschnitten und die Größen der entstandenen DNA-Stücke mittels Agarosegelelektrophorese geprüft.

3.6.12 Dephosphorylierung von Oligonukleotiden

Um zu verhindern, dass sich die Signalpeptide aus den verdauten pMSPs wieder verbinden und es zum Einbau mehrerer Signalpeptide nacheinander in den pJMBm75 kommt, wurde der Signalpeptid-Mix dephosphoryliert. Dazu wurde die Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP, New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

3.6.13 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente durch ihre negative Ladung in einem Spannungsfeld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Fragmente werden durch Interkalierung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Die DNA-Proben werden mit 6x Purple Loading Dye (New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA) gemischt und je nach Größe der DNA-Stücke auf ein 1 bis 1,7%iges Agarosegel (1 - 1,7 % (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer) aufgetragen. Zur Größenabschätzung der DNA wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific™, Waltham, USA) mit aufgetragen. Die Trennung erfolgte in 1x TAE Puffer bei 100 V. Die Agarosegele wurden für 30 min im Ethidiumbromidbad (Tabelle 19) gelagert und die DNA anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 19: Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

Lösung	Zusammensetzung
1x TAE Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA auf pH 8 mit Essigsäure einstellen
Ethidiumbromidlösung	0,001% (w/v) Ethidiumbromid in ddH ₂ O

3.6.14 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Nach einem Restriktionsverdau wurden die geschnittenen DNA-Fragmente elektrophoretisch gereinigt. Dazu wurden die DNA-Fragmente auf dem Blauschirm (BL Star 16, Biometra, Göttingen, Deutschland) aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gel wurde mit dem Farbstoff Gelstar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Basel, Schweiz) nach dem Lauf im Dunkeln für 40 min gefärbt (4 µL Farbstoff in 40 mL 1x TAE-Puffer). Die nach dem Ausschneiden aus dem Gel erhaltenen DNA-Abschnitte wurden mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Zur Elution wurde vorgewärmtes ddH₂O verwendet, welches 10 min auf der Membran inkubiert wurde. Bei der Isolation von Signalpeptid-DNA aus pMSPs wurde ein 1,7%iges Agarosegel verwendet und die ausgeschnittenen Fragmente wegen ihrer geringen Größe mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll „Extraction of 40 bp to 50 kb DNA fragments from Agarose Gels“ gereinigt.

3.6.15 Ligation

Die Ligation von DNA-Doppelsträngen, die jeweils mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, wurde mit der T4-DNA-Ligase von New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) durchgeführt. Der Ligationsansatz bestehend aus 1,5 µL geschnittener Zielvektor-DNA, 7,5 µL Insert, 1 µL T4-DNA-Ligasepuffer und 0,5 µL T4-DNA-Ligase wurde für 16 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wurden kompetente *E. coli* DH10B Zellen damit transformiert. Bei der Insertion von Signalpeptid-Sequenzen in den Vektor pJMBm75 wurden 4 µL des Vektors und 4,5 µL des aus dem Agarosegel gereinigten Signalpeptid-Mixes verwendet.

3.6.16 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurde eine Sequenzierung der Plasmid-DNA an den entsprechenden modifizierten Abschnitten bei der Firma GATC/Eurofins oder Microsynth Seqlab nach der Sanger-Methode in Auftrag gegeben. Die genutzten Primer sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

3.7 Rekombinante Proteinproduktion und -reinigung in *Bacillus megaterium*

3.7.1 Proteinproduktion im Mikrobioreaktor, Schüttelkolben und Rührkesselreaktor

Kultivierung im Mikrobioreaktor:

Für erste Screeningversuche zur Sekretion mit veränderten SPs der FJAT-PGA wurde eine Vorkultur bestehend aus je 1 mL LB_{Tet}-Medium in 48-well FlowerPlates (m2p-labs) mit je einer Einzelkolonie von

LB_{Tet}-Agarplatten inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 1200 rpm im Mikrobioreaktor (BioLector®, m2p-labs, Baesweiler, Deutschland) kultiviert. Aus diesen Vorkulturen wurden 1,2 mL LB_{Tet}-Medium mit 2,5 mM CaCl₂ und 0,5 % (w/v) Xylose im Verhältnis 1:100 angeimpft und für 24 h bei 37 °C und 1200 rpm inkubiert.

Für weitere Kultivierungen von *B. megaterium* MS941 im Mikrobioreaktor (BioLector®, m2p-labs, Baesweiler, Deutschland) zum Screening mit verschiedenen SPs aus pMSPs wurden die Klone, Positiv- und Negativkontrolle ebenfalls vorab auf einer LB_{Tet}-Agarplatte ausgestrichen und zum Inokulieren von 5 mL LB_{Tet}-Vorkulturen genutzt, da die Vorkulturen zuvor in Mikrottestplatten unregelmäßig gewachsen waren. Die Kultivierung wurde in 48-well FlowerPlates im Mikrobioreaktor bei 37 °C und 1400 rpm für 24 h durchgeführt. Dazu wurde pro Well 1 mL LB_{Tet}-Medium mit 0,5 % (w/v) Xylose und 2,5 mM CaCl₂ versetzt und mit der Übernacht-Vorkultur auf eine OD₅₇₈ von 0,055 angeimpft.

Während der Kultivierungen im Mikrobioreaktor wurde das Wachstum durch Streulichtmessung bei 620 nm überwacht. Nach 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (3345 g, 20 min, 4 °C) sedimentiert und der Überstand für die folgende Aktivitätsbestimmung genutzt.

Kultivierung im Schüttelkolben:

Für Kultivierungen im Schüttelkolben wurde zunächst eine 50 mL Vorkultur angelegt. Dazu wurden 50 mL LB_{Tet}-Medium in einem 300 mL Schikanekolben mit einer Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur von rekombinanten *B. megaterium* oder *B. subtilis* inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle in Expressionsexperimenten wurden *B. megaterium* oder *B. subtilis* transformiert mit dem Vektor p3STOP1623hp ohne *pga*-Gen verwendet. Für Expressionsanalysen wurden 50 mL LB_{Tet}-Medium in einem 300 mL Schikanekolben und für Proteinreinigungen 200 mL LB_{Tet}-Medium in einem 1 L Schikanekolben verwendet. Die Hauptkulturen wurden mit 2,5 mM CaCl₂ (außer FJAT-PGA) versetzt, 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,3 bis 0,5 wurde durch Zugabe von 0,5 % (w/v) induziert. Anschließend wurde für 20 bis 24 h inkubiert und durch Zentrifugation Zellen vom proteinenthaltenden Überstand getrennt.

Kultivierung im Rührkesselreaktor:

Für die Kultivierung von *B. megaterium* im Rührkesselreaktor wurde ein DASGIP-Kultivierungssystem mit den Modulen TC4SC4, MX4/4, PH4PO4, CWD4 und vier 1 L Rührkesseln benutzt. Als Rührer wurden dreistufige, sechsblättrige Rushton-Turbinen verwendet. Vor dem Autoklavieren wurden jeweils 500 mL LB-Medium eingefüllt und anschließend 10 µg/mL Tetracyclin steril zugegeben. Um Schaumbildung zu verhindern, wurde vor dem Start der Kultivierung 0,1 % (v/v) vom Antischaummittel Ucolub® zugegeben. Die Inokulation mit 10 mL einer *B. megaterium* Übernachtskultur erfolgte mit einer Spritze steril über das Septum. Die Induktion der Proteinproduktion mit 0,5 % (w/v) Xylose erfolgte entweder direkt zu Beginn der Kultivierung oder bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,4. Während der Kultivierung wurde die Temperatur über einen Temperaturfühler online erfasst und durch einen Heiz- und Kühlmantel auf 37 °C konstant gehalten. Außerdem wurden die Gelöstsauerstoff-Konzentration (DO) (VISIFERM DO 225 (ECS), Hamilton) und der pH-Wert (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo) über Sonden erfasst. Der Rührkesselreaktor wurde durch ein Begasungsrohr mit steriler Luft mit einem Volumenstrom von 45 L/h entsprechend 1,5 VVM (1,5 L_{Luft}/(L_{Kultur} min)) begast. Die Rührerdrehzahl

wurde abhängig von der DO geregelt. Bei einer DO > 30 % lag sie bei 500 min⁻¹ und bei darunter sinkender DO wurde die Rührerdrehzahl linear bis 700 min⁻¹ bei 0 % DO erhöht. Die Probennahme erfolgte über ein Tauchrohr. Nach Beenden der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation (3315 g, 4 °C, 30 min) vom PGA-enthaltenden Überstand getrennt.

3.7.2 Proteinreinigung durch Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IAC) können Proteine aufgrund ihrer Oberflächenladung getrennt und gereinigt werden. Geladene Proteine binden an funktionelle Gruppen der Matrix und können durch Verdrängung durch andere Ionen wieder eluiert werden. Die PGA wurde direkt aus dem Überstand durch IAC gereinigt. Dazu wurde nach 20 bis 24 h Proteinproduktion der zellfreie Überstand mit dem sekretierten Protein durch Zentrifugation (3345 g, 4 °C, 20 min) und Sterilfiltration (0,22 µm) gewonnen. Bm-, Bmas-, FJAT-PGA sowie deren Varianten und die Hybrid-PGAs HP10, 22 und 23 wurden durch Kationenaustauschchromatographie mittels SP-Sepharose (GE Healthcare, München, Deutschland) (Rojviriya et al. 2011) gereinigt. Die SP-Sepharose wurde zuerst mit Wasser und anschließend mit 5 SV 50 mM Natriumphosphat (NaPh)-Puffer (pH 5,5) äquilibriert. Der pH-Wert des Überstandes wurde auf 5,5 eingestellt und der Überstand über die Säule gegeben (200 bis 300 mL pro mL SP Sepharose). Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit 5 SV 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) entfernt. Die PGA wurde stufenweise durch Zugabe von jeweils 2 mL 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) mit 100 bis 700 mM NaCl eluiert. BtPGA und HP7 wurden durch Anionenaustauschchromatographie mittels Q-Sepharose (GE Healthcare, München, Deutschland) gereinigt. Dazu wurde 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) zur Äquilibration und zum Waschen verwendet. Der pH-Wert des Überstandes wurde auf 8 eingestellt und 200 bis 300 mL Überstand pro mL Q-Sepharose gegeben und stufenweise mit 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) mit 100 bis 500 mM NaCl eluiert. Die Säulen wurden abschließend mit 1 M NaCl in NaPh bzw. Tris-HCl-Puffer gewaschen und in 20 % (v/v) EtOH bei 4 °C gelagert.

Die Reinigung der SER-Mutanten der FJAT-PGA und die FJAT-PGA wurde außerdem mit einem ÄKTApurifier™ System mit Probenpumpe und einer 5 mL HiTrap™ SP FF Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) etabliert. Dazu wurden alle verwendeten Lösungen filtriert (0,45 µm) und im Ultraschallbad entgast. Der Kulturüberstand wurde filtriert (0,22 µm) und der pH-Wert auf 5,5 eingestellt. Die Säule und das gesamte System wurden zunächst mit ddH₂O gespült und dann mit 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) äquilibriert. Der Kulturüberstand wurde mit einer Flussrate von 2 mL/min mithilfe einer Probenpumpe über die Säule gegeben. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit 3 SV 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) bei 2 mL/min entfernt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 bis 800 mM NaCl Konzentration in 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) über 8 SV bei einer Flussrate von 2 mL/min und einer Gradienten-Verzögerung jeweils von 2 mL. Die eluierten Proteine wurden in 2 mL Fraktionen aufgefangen. Stark gebundene Moleküle wurden abschließend durch Spülen mit 5 SV 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) und 1 M NaCl mit 2 mL/min eluiert.

Alle erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.7.3 Proteinreinigung durch präparative Gelpermeationschromatographie

Durch Gelpermeationschromatographie (GPC), auch Größenausschlusschromatographie, können Proteine nach ihrer Molekülgröße getrennt werden. Das Verfahren beruht auf unterschiedlichen Retentionszeiten von Molekülen unterschiedlicher Größe in einem porösen Material. Kleinere Moleküle haben eine längere Retentionszeit, sodass große Moleküle zuerst eluiert werden. In dieser Arbeit wurde die präparative GPC als finaler Reinigungsschritt nach der IAC und vor der Kristallisation für die Strukturaufklärung verwendet. Dazu wurden die Proteinlösungen nach der IAC auf etwa 10 mg/mL konzentriert, filtriert (0,45 µm) und 1 bis 2 mL auf eine HiLoad 26/600 Superdex 75 Chromatographiesäule (GE Healthcare, München, Deutschland) geladen. Die Säule wurde vorher mit 2,5 SV ddH₂O und 3 SV GPC-Puffer (BtPGA, HP7: 20 mM Tris-HCl pH 8 und 150 mM NaCl, alle anderen PGAs: 50 mM NaPh-Puffer pH 5,5 und 150 mM NaCl) äquilibriert. Alle genutzten Lösungen wurden filtriert (0,45 µm) und im Ultraschallbad entgast. Nach der Aufgabe der Probe wurde mit GPC-Puffer eluiert. Es wurden 2 mL-Fractionen gesammelt und Fractionen mit UV-Signal bei 280 nm (Protein) mittels SDS-PAGE analysiert.

3.7.4 Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen

Aus der Reinigung erhaltene Proteinfraktionen wurden durch Filtrationszentrifugation mit Amicon Ultra-Zentrifugationseinheiten (4 oder 15 mL, MWCO 10.000, Merck Millipore, Burlington, USA) bei 4 °C und 3345 g konzentriert. Die Filter wurden vor der Konzentrierung mit ddH₂O gespült. Um überschüssiges Salz aus den Proteinlösungen zu entfernen und den Puffer zu tauschen, wurden die Verfahren der Größenausschlusschromatographie oder Dialyse verwendet. Zur Größenausschlusschromatographie wurden NAP™-25 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Proteine, die kristallisiert werden sollten, wurden durch Dialyse in 10 mM HEPES pH 7 umpuffert. Dazu wurde eine Mikrodialysierkapsel (QuixSep 1 mL, Roth) und ein Dialyseschlauch (Visking, Cellulose (MWCO 14.000) aufgekocht. Anschließend wurde die Proteinlösung in die Kapsel gefüllt, die Kapsel mit dem Dialyseschlauch verschlossen und bei 4 °C in 1 L 10 mM HEPES pH 7 gerührt. Nach 2 und 6 h wurde der Puffer gewechselt und nach dem letzten Pufferwechsel für weitere 16 h dialysiert.

3.8 Biochemische Charakterisierung

3.8.1 Analyse der extrazellulären Proteine durch Ammoniumsulfatfällung

Zur Analyse der extrazellulären, von *B. megaterium* oder *B. subtilis* sekretierten Proteine wurden diese durch die Zugabe von Ammoniumsulfat aus dem Kulturüberstand, der durch Zentrifugation (17000 g, 4 °C, 10 min) erhalten wurde, gefällt. Dazu wurde je 1,5 mL zellfreier Kulturüberstand mit 660 mg Ammoniumsulfat für 2 h bei 4 °C und 1000 rpm geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 17.000 g und 4 °C für 30 min wurden die gefällten Proteine in 10 bis 20 µL ddH₂O suspendiert und mithilfe der SDS-PAGE analysiert.

3.8.2 Analyse löslicher und unlöslicher, intrazellulärer Proteine aus *Bacillus megaterium*

Das Zellsediment aus zwei OD-Äquivalenten einer *B. megaterium*-Kultur wurde in 20 µL Aufschlusspuffer (100 mM Na₃PO₄, 5 mg/mL Lysozym, 2 µL/mL Benzonase (Sigma Aldrich, 25 U/µL), pH 6,5 mit H₃PO₄ einstellen) resuspendiert und 30 min bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach Zentrifugation (17000 g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand per SDS-PAGE zur Analyse der löslichen, intrazellulären Proteine genutzt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Sediment wurde in 20 µL 8 M Harnstoff resuspendiert. Nach Zentrifugation (17000 g, 4 °C, 10 min) wurden im Überstand die unlöslichen, intrazellulären Proteine mittels SDS-PAGE analysiert.

3.8.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse verwendet. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine zunächst im Sammelgel fokussiert und im Trenngel aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Proteinproben wurden mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 10 min erhitzt und auf Polyacrylamidgele aufgetragen (Tabelle 20 und 21).

Tabelle 20: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.

Bestandteil	Sammelgel 6 % Acrylamid [mL]	Trenngel 12 % Acrylamid [mL]
30 % (w/v) Acrylamid	0,5	2
500 mM Tris-HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS	0,625	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS	-	1,25
dH ₂ O	1,375	1,75
10 % (w/v) APS	0,025	0,05
TEMED	0,0025	0,005

Tabelle 21: Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE-Analyse.

Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (4x)	40 % (w/v) Glycerin 2 mM β-Mercaptoethanol 110 mM SDS 3 mM Bromphenolblau 100 mM Tris-HCl pH 6,8
Färbelösung	30 % (v/v) EtOH 10 % (v/v) Essigsäure 1 g/L Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung	30 % (v/v) EtOH 10 % (v/v) Essigsäure
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS

Zur Abschätzung der relativen Masse wurde ein ungefärbter Proteinmarker (Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 180 V angelegt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel für 1 bis 2 h in Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung bis die Gelmatrix entfärbt war (Tabelle 21).

3.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels Bradford-Assay bestimmt. Dieser basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm durch Komplexbildung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau in saurer Lösung (Bradford 1976). Es wurden jeweils 30 µL Probe oder Puffer als Vergleichswert mit 1,5 mL Bradford-Reagenz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Absorptionsdifferenz aus Probe und Puffer berechnet. Die Proteinkonzentration wurde durch eine mit Rinderserumalbumin aufgenommene Standardgerade bestimmt.

$$c = 714,63 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * \Delta OD_{595} - 17,02 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

3.8.5 NIPAB-Assay zur Bestimmung der PGA-Aktivität

Anstelle des natürlichen Substrats Penicillin G wurde zur schnellen Bestimmung der PGA-Aktivität das synthetische Substrat 2-Nitro-5-[(phenylacetyl)amino]-benzoesäure (NIPAB) in einem kinetischen Enzym-Assay genutzt. Durch Spaltung von NIPAB durch PGAs wird der Farbstoff 2-Nitro-5-aminobenzoesäure (NABA) freigesetzt, welcher bei 405 nm absorbiert. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 90 µL Substratlösung (600 mg/L NIPAB in 9,4 mM NaH₂PO₄ und 40,6 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) in Mikrotiterplatten mit flachem Boden vorgelegt und auf 37 °C temperiert. Zum Starten der Reaktion wurden 10 µL ebenfalls vorgewärmter zellfreier Überstand oder 0,5 bis 1 µg gereinigtes Enzym gegeben, gemischt und bei 37 °C inkubiert. Die Absorption (A) bei 405 nm wurde alle 6 s über einen Zeitraum von 3 min im Mikroplatten-Lesegerät (NanoQuant infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Die volumetrische enzymatische Aktivität EA [U/mL] wurde über die zeitabhängige Steigung der Absorption dA/dt [min⁻¹] nach folgender Formel berechnet.

$$EA = \frac{\frac{dA}{dt} \cdot V_R}{\epsilon \cdot d \cdot V_E}$$

Hierbei sind V_R das Volumen des gesamten Reaktionsansatzes (0,1 cm³), V_E das Volumen der Enzymlösung (0,01 cm³), ε der molare Extinktionskoeffizient (8,98 cm²/µmol) und d die Schichtdicke der Reaktionslösung (0,315 cm). Die spezifische Enzymaktivität EA_{spez} [U/mg] kann durch Division der volumetrischen Enzymaktivität durch die entsprechende Proteinkonzentration bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde eine Ultra-Mikro-Küvette (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) im temperierbaren Küvettenhalter eines UV-VIS-Spektrometers (Jasco V-650, Pfungstadt, Deutschland) verwendet. Hierbei waren V_R = 0,111 cm³, V_E = 0,0111 cm³ und d = 1 cm. Die Absorption wurde nach Zugabe der erwärmten Enzymlösung zur auf die entsprechende Temperatur geheizten Substratlösung für 1 min bei 405 nm gemessen.

3.8.6 Thermal Shift Assay

Um die Thermostabilität von PGAs zu bestimmen, wurde mithilfe des Thermal Shift Assays der Schmelzpunkt bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 4 und 9 bestimmt (Pantoliano et al. 2001). Um die besten Pufferbedingungen für die Wildtyp-Enzyme zu bestimmen, wurden jeweils 5 µL Proteinlösung (2 mg/mL), 40 µL der entsprechenden Puffer und 5 µL SYPRO™ Orange Farbstoff (50x) in transparenten PCR-Mikrotiterplatten gemischt. Der SYPRO™ Orange Farbstoff bindet an hydrophobe Aminosäurereste, die während der hitzebedingten Entfaltung der Proteine freigelegt werden, sodass mit zunehmender Entfaltung eine steigende Fluoreszenz messbar ist (Lo et al. 2004). Die Fluoreszenz wurde während eines Temperatur-Gradienten von 10 bis 90 °C im Thermocycler CFX96 (Bio-Rad, Hercules, USA) gemessen, wodurch sich eine Schmelzkurve ergab. Zunächst ist die gemessene Fluoreszenz niedrig, da der Farbstoff in polarer Umgebung in Gegenwart der hydrophilen, an der Oberfläche liegenden Seitenketten des Proteins nur schwach fluoresziert. Durch die Hitzedenaturierung gelangen die hydrophoben, sonst im Proteininneren liegenden Reste nach außen und die Fluoreszenz steigt mit zunehmender Temperatur. Bei weiterer Temperaturerhöhung kommt es durch Proteinaggregation wieder zu verringerter Fluoreszenzintensität. Die Schmelztemperatur ist als die Temperatur am stärksten Anstieg der Fluoreszenz, also dem Wendepunkt der Schmelzkurve, definiert. Sie kann als das Minimum der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurve ermittelt werden (Niesen et al. 2007). Der Schmelzpunkt kann mithilfe des Programms CFX Manager errechnet werden. Die optimalen Puffer variierten für die verschiedenen PGAs: BmPGA (20 mM Tris-HCl pH 8), BtPGA (40 mM Tris-HCl pH 8 mit 150 mM NaCl) und FJAT-PGA (40 mM HEPES pH 7).

3.8.7 N-terminale Protein-Sequenzierung

Um die N-terminale Proteinsequenz der PGA-Untereinheiten zu verifizieren, wurden die Untereinheiten durch automatische Edman-Degradierung N-terminal sequenziert (Edman and Begg 1967). Dazu wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels der „Semidry-Blot“ Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran (Roti®; 0,45 µm Porengröße) übertragen. Auf dieser werden die Proteine immobilisiert und können in dieser Form der automatischen Edman-Degradierung zugeführt werden. Zunächst wurden die Proteine wie in 3.8.3 beschrieben aufgetrennt. Dabei wurde ein vorgefärbter Proteinmarker verwendet. Danach wurde das Gel 15 min in 1x Towbinpuffer (Tabelle 22) äquilibriert. Methanol im Towbinpuffer führt zu einer Verkleinerung der Poren des SDS-Gels, deshalb wurde bei sehr großen Proteinen darauf verzichtet. Die PVDF-Transfermembran wurde erst für 15 min in Methanol und dann in Towbinpuffer äquilibriert. Nach der Äquilibration wurde der Blot aufgebaut, indem erst ein mit Towbinpuffer getränktes Whatmanpapier in Gelgröße in das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, USA) gelegt wurde. Darüber wurden die Transfermembran, das Gel und ein weiteres Whatmanpapier luftblasenfrei geschichtet und die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen (1,3 mA, 25 V, 12 min). Das Gel wurde danach zur Kontrolle des Blotvorgangs in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Proteine auf der Membran wurden durch Färbung mit 1x Ponceau S visualisiert, die Proteinbanden ausgeschnitten und zur N-terminalen Protein-Sequenzierung an Beate Jaschok-Kentner (HZI Braunschweig) gegeben.

Tabelle 22: Lösungen für die Western Blot Analyse.

Lösung	Zusammensetzung
Towbin-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 9,5 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
5x Ponceau S	2 % (w/v) Ponceau S 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure

3.8.8 Bestimmung von PGA-Aktivität und Substratspektrum mittels HPLC

Um die Hydrolyse-Aktivität von PGAs gegenüber ihren natürlichen Substraten zu untersuchen, wurden Aktivitätstests und HPLC-Messmethoden etabliert. Die in Tabelle 23 gelisteten Enzymmengen an FJAT-PGA, BtPGA, BmPGA und EcPGA wurden mit 10 mM des jeweiligen Substrates in 50 mM NaPh-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C und 500 rpm für 1 h im Thermomixer inkubiert. Nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 min Inkubationszeit wurden Proben genommen und die Reaktion direkt durch Zugabe des gleichen Volumens an Methanol gestoppt (Daumy et al. 1985). Als Nullprobe wurde der gleiche Ansatz ohne Enzym verwendet. Die Proben wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Dazu wurden 10 µL der Probe auf eine Chromolith® HighResolution RP-18e HPLC Säule injiziert und zur Trennung und Detektion ein Merck-Hitachi LaChrom HPLC System verwendet. Die Spezifikationen der isokratischen Messmethode befinden sich in Tabelle 24. Die Ofentemperatur betrug 40 °C und die Flussrate 1 mL/min. Die Substrate und Produkte wurden bei 220 nm detektiert. Die spezifische Enzymaktivität (EA) wurde durch die Abnahme der Substratkonzentration über die Zeit in U/mg bestimmt.

Tabelle 23: Für Aktivitätstests eingesetzte Enzymmengen für verschiedene Substrate unter Angabe des jeweiligen Herstellers.

Substrat	Hersteller	PGA	Eingesetzte Enzymmenge [µg/mL]
Penicillin G	Sigma Aldrich	FJAT	0,1 bis 2
		Bt, Bm, Ec	2
Penicillin V	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm, Ec	20, 30
Ampicillin	Carl Roth	FJAT, Bm	4, 6
		Bt Ec	4, 10
Carbenicillin	Carl Roth	FJAT, Bt, Bm, Ec	60
Amoxicillin	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm	60
		Ec	10
Cefalexin	Sigma Aldrich	FJAT, Bm	4, 6
		Bt, Ec	4, 10
Cefaclor	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm, Ec	4, 6
Nafcillin	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm, Ec	60
Oxacillin	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm, Ec	60
Cefotaxim	Sigma Aldrich	FJAT, Bt, Bm	50, 60
		Ec	60, 80
Cefradin	European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard	FJAT, Bt	20, 40
		Bm, Ec	20, 30

Tabelle 24: Benutze HPLC-Methoden für die verschiedenen Substrate.

Substrat	Laufpuffer		Zeit [min]
	50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 3) [%]	90 % Acetonitril [%]	
Penicillin G	70	30	5 - 7
Penicillin V	70	30	7
Ampicillin	87	13	5 - 7
Carbenicillin	70	30	7
Amoxicillin	96	4	7
Cefalexin	87	13	7
Cefaclor	91	9	8
Nafcillin	70	30	13
Oxacillin	70	30	11
Cefotaxim	84	16	5
Cefradin	84	16	5

3.9 Proteinkristallisation und Quervernetzung

3.9.1 Dampfdiffusionskristallisation im Sitting Drop-Verfahren

Kristallisationsexperimente zur Herstellung von Kristallen zur Strukturaufklärung wurden bei 17 °C als Dampfdiffusionskristallisation im Sitting Drop-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde 1 µL Proteinlösung (5 bis 10 mg/mL) mit 1 µL Reservoirpuffer (= Kristallisationspuffer) aus einem 60 µL Reservoir in Intelli-Plates 96-3 (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA) gemischt. Reservoirpufferbedingungen zum Screening stammten aus den NeXtal Tube Suites Cryos, JCSG Core I und II (Qiagen, Hilden, Deutschland). FJAT-Kristalle zur Strukturaufklärung wurden aus der Bedingung 85 mM HEPES (pH 7,5), 8,5 % (w/v) PEG 8000 und 15 % (v/v) Glycerin erhalten. BtPGA Kristalle entstanden in einer Lösung mit 18 mM Calciumchlorid, 90 mM Natriumacetat (pH 4,6), 27 % (v/v) MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol) und 10 % (v/v) Glycerin während BmPGA Kristalle aus 200 mM Magnesiumchlorid mit 20 % (w/v) PEG 3350 erhalten wurden.

3.9.2 Dampfdiffusionskristallisation im Hanging Drop-Verfahren

Kristallisationsexperimente zur Herstellung von Kristallen für mechanische Messungen wurden bei 17 °C nach dem Dampfdiffusionsprinzip im Hanging Drop-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden silikonisierte Deckgläschen (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) mit Silikonöl am Deckel von Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm befestigt. In das Unterteil der Petrischale wurde 1 mL Kristallisationspuffer in einem Deckel eines 15 mL Zentrifugenröhrchens als Reservoir gegeben. Auf die silikonisierten Deckgläschen wurden jeweils 1 bis 3 Tropfen mit je 5 bis 10 µL Volumen bestehend aus Proteinlösung (5 bis 10 mg/mL), Kristallisationspuffer und bei Bedarf Kristallbruchstücken als Nukleationskeime in unterschiedlichen Verhältnissen pipettiert. Die Petrischale wurde vorsichtig geschlossen, mit Parafilm verschlossen und bei 17 oder 21 °C gelagert bis Kristalle gewachsen waren. Bei der Benutzung von Kristallbruchstücken (Kristall-Seeds) wurde eine abgewandelte Form verwendet. Die Deckgläschen wurden dabei nicht am Deckel, sondern am Boden der Petrischale

befestigt, sodass es sich um ein Sitting Drop-Verfahren in Petrischalen handelte. Die weitere Durchführung erfolgte wie beim Hanging Drop-Verfahren.

3.9.3 Fällungskristallisation

Zunächst wurde die Fällungskristallisation in einem Volumen von 10 µL getestet. Dazu wurden Kristallisationspuffer (= Fällungspuffer), Proteinlösung und konzentrierte Seedlösung in verschiedenen Verhältnissen gemischt und ohne Reservoir bei 17 °C für 15 bis 30 min inkubiert. Die Kristallbildung konnte mikroskopisch überprüft werden. Bei erfolgreicher Kristallbildung wurde der Ansatz mit gleichem Mischungsverhältnis auf ein Volumen von 500 µL in ein Reaktionsgefäß übertragen. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.9.4 Herstellung und Einsatz von Kristall-Seeds

Kristallbruchstücke (Seeds) wurden als Nukleationskeime für weitere Kristallisationsansätze aus bereits gewachsenen Kristallen hergestellt. Dazu wurden die Kristalle in einem 10 µL-Tropfen zerkleinert, mit einer Pipettenspitze in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf ein Volumen von 50 µL mit Kristallisationspuffer aufgefüllt. Nach Zugabe eines HR-320 PTFE Seed Beads (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) wurde der Ansatz 30 s mithilfe des Vortexmischers gemischt und dann 30 s auf Eis gelagert. Das Vorgehen wurde weitere fünf Male wiederholt. Anschließend wurde die Kristallbruchstück-Suspension direkt 1:5 verdünnt und daraus weitere Verdünnungen bis 1:10.000 hergestellt. Die Seed-Suspension wurde direkt eingesetzt oder bei -80 °C gelagert. Vor der Zugabe der Kristallbruchstück-Suspension zu einem Kristallisationsansatz wurde diese mit dem Vortexmischer geschüttelt, um sedimentierte Kristalle aufzuwirbeln.

3.9.5 Quervernetzung

Zur Stabilisierung der Enzymkristalle wurden diese mit Glutaraldehyd quervernetzt. Diese quervernetzten Enzymkristalle (engl. cross-linked enzyme crystals, CLECs) wurden zur Messung der mechanischen Eigenschaften eingesetzt. Vor der Quervernetzung wurden die Hanging oder Sitting Drop-Kristallansätze in Petrischalen auf Eis gekühlt, um einen osmotischen Schock und das Platzen der Kristalle zu verhindern. Anschließend wurde die Mutterlauge von den Kristallen durch Absaugen mit einem Präzisionstuch entfernt und die Kristalle mehrmals mit 5 bis 10 µL des entsprechenden Kristallisationspuffers gewaschen. Danach wurde 10 µL Vernetzungslösung bestehend aus dem entsprechenden Kristallisationspuffer mit 5 % (v/v) Glutaraldehyd auf die Kristalle gegeben, die Petrischale gut verschlossen und für 24 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen konnten die CLECs in Wasser (3.10.2) vermessen werden.

3.10 Messung von Kristallen und CLECs

3.10.1 Strukturaufklärung – Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung

Die Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung wurde in Kooperation mit Dr. Jan Pippel, Dr. Peer Lukat und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt vom HZI Braunschweig durchgeführt. FJAT- und BtPGA-Kristalle wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. BmPGA-Kristalle wurden zunächst in

Mutterlauge mit 10 % (v/v) (2R,3R)-(-)-2,3-Butandiol als Kälteschutzmittel gewaschen und dann ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren (Mayer et al. 2019). Beugungsdaten wurden für die FJAT- und BmPGA an der Beamline PXIII der Swiss Light Source (SLS, Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) und für die BtPGA, FJAT-PGA mit Phenylelessigsäure und FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 an der Beamline P11 des PETRAIII Synchrotron (DESY, Hamburg) (Burkhardt et al. 2016) aufgenommen. Zur Vorbereitung der Daten für deren spätere Auswertung wurden zunächst die Programme XDS (Kabsch 2010), AIMLESS (Evans and Murshudov 2013) und, bei der BmPGA wegen anisotropen Verhaltens, der STARANISO-Server (Tickle et al. 2018) statt AIMLESS verwendet. Zur Lösung der FJAT-PGA-Struktur wurde die PGA aus *Providencia rettgeri* (PDB 1CP9) (McDonough et al. 1999) als Vergleichsmodell für die PHASER-Software (McCoy et al. 2007) genutzt. Die PGA aus *Providencia rettgeri* wurde gewählt, da sie die größte Sequenzidentität der bereits gelösten Strukturen mit der Sequenz der FJAT-PGA aufwies. Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte in Coot (Emsley et al. 2010) und durch Computer-basierte Optimierung mit phenix.refine (Afonine et al. 2012). Zur Lösung der weiteren PGA-Strukturen wurde die FJAT-PGA als Suchmodell verwendet. Alle Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung sind in Mayer et al. (2019) und im Anhang zu finden (Tabelle 36 und 37). Die Koordinaten und Strukturen wurden in der Proteindatenbank PDB (Berman et al. 2000) hinterlegt und sind als PDB-Einträge 6NVX (FJAT-PGA), 6NVY (BtPGA) und 6NVW (BmPGA) zu finden (Mayer et al. 2019).

3.10.2 Mechanische Messung von CLECs durch Nanoindentation

Die Messungen zur mechanischen Stabilität der CLECs wurden in Kooperation von Marta Kubiak am Institut für Partikeltechnik durchgeführt. Dazu wurden quervernetzte FJAT-, Bt- und BmPGA-Kristalle mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM, engl. Atomic Force Microscope) JPK NanoWizard3 indentiert. Es wurde mit einem Cantilever mit sphärischer (kugelförmiger) Spitze mit einem Radius von 150 bis 300 nm (B300 on NCHAu, Nanotools GmbH, München, Deutschland) mit einer Kraft von 250 nN auf die CLECs gedrückt und eine Kraft-Weg-Kurve aufgenommen. Die Messung wurde an mindestens zwölf Messpunkten pro Kristall wiederholt. Die Daten wurden mit der JPK Datenverarbeitungssoftware analysiert und Härte und Elastizitätsmodul nach Oliver und Pharr berechnet (Kubiak et al. 2018).

4 Ergebnisse und Diskussion

Penicillin G Acylasen (PGAs) sind industriell zur Synthese semi-synthetischer β -Lactam-Antibiotika eingesetzte Enzyme. PGAs katalysieren die Hydrolyse von natürlichen β -Lactam-Antibiotika wie beispielsweise Penicillin G zu 6-Aminopenicillansäure (6-APA) und Phenyllessigsäure (PAA) sowie die folgende Synthese von semi-synthetischen β -Lactam-Antibiotika aus Vorstufen wie 6-APA (Marešová et al. 2014). In dieser Arbeit sollte dieses industriell relevante Enzym charakterisiert und hinsichtlich der thermischen und mechanischen Stabilität verbessert werden. Durch Datenbanksuche sollten neuartige PGAs mit verbesserten Eigenschaften identifiziert und charakterisiert werden. Durch Protein Engineering und Immobilisierung sollten anschließend die Kristallisierbarkeit der PGAs und deren thermische sowie mechanische Stabilität optimiert werden.

Im Gegensatz zur intrazellulären oder periplasmatischen Ansammlung rekombinant produzierter Proteine in *E. coli* beispielsweise als inclusion bodies, können rekombinante Proteine von *B. megaterium* direkt in das umgebende Medium sekretiert werden. Dies bietet Vorteile im folgenden Downstreamprocessing.

Teilergebnisse der Kapitel 4.1 bis 4.3 und 4.6 wurden bereits in Mayer et al. (2019) veröffentlicht. Einige Ergebnisse sind teilweise in Zusammenarbeit mit Masterstudierenden entstanden (Müller 2018 (4.6); Wichmann 2020 (4.7)).

4.1 Identifikation und Produktion neuartiger Penicillin G Acylasen

Um neuartige PGAs mit interessanten neuen Eigenschaften zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit durch vergleichende Analyse von Aminosäuresequenzen mittels des BLAST-Algorithmus (NCBI) hypothetische PGAs aus Gram-positiven Bakterien ermittelt. Als Grundlage dieser Datenbanksuche diente die Aminosäuresequenz der PGA aus *B. megaterium* ATCC14945 (BmPGA). Die BmPGA ist ein Heterodimer, das in der Zelle zunächst als Präproprotein (Signalpeptid- α -Untereinheit-Linker- β -Untereinheit) vorliegt. Beim Export werden das Signalpeptid und nach der Faltung auch der Linker zwischen α -Untereinheit und β -Untereinheit abgespalten. Außerhalb der Zelle liegt das aktive Enzym dann als Heterodimer aus α -Untereinheit und β -Untereinheit vor. Für die BLAST-Analyse wurde die PräproBmPGA-Sequenz verwendet, weil das Signalpeptid und der Linker für den Export bzw. die Prozessierung von Bedeutung sind. Die ausgewählten hypothetischen PGAs aus *Bacillus* sp. FJAT-27231, *Bacillus thermotolerans*, *Bacillus niacini*, *Bacillus* sp. UNC438CL73TsuS30 und *Bacillus massiliogorillae* haben eine große Ähnlichkeit von 52 bis 71 % zur PGA aus *B. megaterium* ATCC14945 und stammen alle aus verschiedenen *Bacillus* spp. (Tabelle 25). Außerdem besitzen sie ein Signalpeptid, sodass die Sekretion in das umgebende Medium durch den Produktionsorganismus *B. megaterium* und damit eine erleichterte Reinigung der Proteine ermöglicht werden sollte. Das Vorhandensein eines Signalpeptids für den Sec-abhängigen Exportweg wurde mit dem Programm SignalP 4.0 überprüft (Petersen et al. 2011). Um eine rekombinante Produktion der PGAs mit *B. megaterium* zu ermöglichen, muss der sogenannte Codon-Adaptationsindex (CAI) des korrespondierenden Gens bei mindestens 0,3 für *B. megaterium* liegen (Finger et al. 2015). Der CAI der entsprechenden hypothetischen *pga*-Gene wurde mit dem Programm JCat überprüft (Grote et al.

2005). Alle CAIs lagen unter 0,3, weshalb die korrespondierenden *pga*-Gene mit einer für *B. megaterium* optimierten Codonverwendung synthetisiert wurden. Der CAI lag danach für alle *pga*-Gene zwischen 0,9 und 0,92.

Tabelle 25: Ausgewählte hypothetische PGAs aus Gram-positiven Bakterien aus der BLAST-Suche basierend auf der PGA-Aminosäuresequenz von *B. megaterium* ATCC14945.

Sequenzbeschreibung laut BLAST*	BLAST-Score	Query Cover (%)	Identität (%)	Zugriffsnummer
RecName: Full=Penicillin G acylase [<i>Bacillus megaterium</i>]	1648	100	100,00	Q60136.1
hypothetical protein [<i>Bacillus</i> sp. FJAT-27231]	1223	100	71,30	WP_049660937.1
hypothetical protein [<i>Bacillus thermotolerans</i>]	1213	99	70,65	WP_039233131.1
hypothetical protein [<i>Bacillus niacini</i>]	905	97	54,00	WP_082799649.1
hypothetical protein [<i>Bacillus</i> sp. UNC438CL73Tsus30]	900	99	52,17	WP_026576929.1
hypothetical protein [<i>Bacillus massiliogorillae</i>]	880	96	54,29	WP_042347357.1

* Für die BLAST-Analyse wurde das Präprotein der BmPGA bestehend aus Signalpeptid- α -Untereinheit-Linker- β -Untereinheit genutzt.

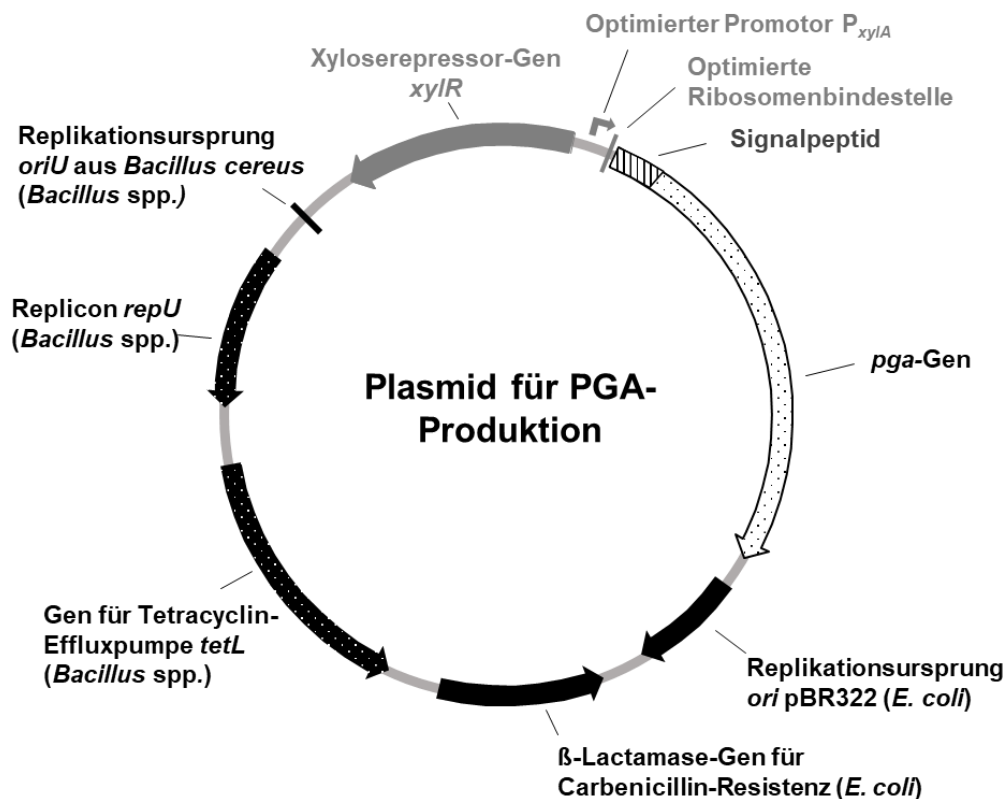


Abbildung 15: Plasmid für die rekombinante Produktion und Sekretion von PGAs mit *B. megaterium*. Die Plasmide basieren auf dem Vektor p3STOP1623hp (Stammen et al. 2010) mit einem optimierten Xylose-induzierbaren Promotor und optimierter Ribosomenbindestelle (grau). Elemente für die Klonierung in *E. coli* sind in schwarz gezeigt, Elemente für die Replikation und Selektion in *B. megaterium* sind in schwarz gepunktet dargestellt. Das *pga*-Gen (weiß gepunktet) hat die codierende Sequenz des jeweiligen nativen Signalpeptids (weiß gestreift) vorgelagert. Modifiziert nach Abbildung S1 aus Mayer et al. (2019).

Die synthetisierten *pga*-Gene mit der codierenden Sequenz für das jeweils native Signalpeptid wurden über BsrGI und BglII in den Shuttlevektor p3STOP1623hp integriert (Abbildung 15). Der Vektor besitzt Elemente für die Replikation und Antibiotika-basierte Selektion zur Klonierung in *E. coli* und zur Produktion von Zielproteinen in *B. megaterium*. Die Genexpression basiert auf dem optimierten Xylose-induzierbaren Promotor P_{xyIA} (Stammen et al. 2010).

Für die Produktion und Sekretion der rekombinanten PGAs wurde der Wirt *B. megaterium* MS941 genutzt, welcher auf dem Stamm DSM319 beruht. MS941 fehlt die extrazelluläre Protease NprM, wodurch in LB-Medium eine 98,5 % geringere extrazelluläre Proteaseaktivität vorhanden ist (Wittchen and Meinhardt 1995). *B. megaterium* MS941 wurde einzeln mit dem jeweiligen zur PGA-Produktion erstellten rekombinanten Plasmid transformiert, kultiviert und die rekombinante Proteinproduktion mit Xylose induziert. Die BmPGA kommt natürlicherweise nur im Genom des *B. megaterium* Stammes ATCC14945 vor (Chiang and Bennett 1967). Daher wurde die BmPGA hier wie die anderen PGAs plasmidbasiert in *B. megaterium* MS941 produziert, um so durch die erhöhte Kopienzahl eine höhere Produktivität zu gewährleisten und Vergleichbarkeit zu den anderen plasmidbasiert produzierten PGAs sicherzustellen. 3, 6 und 22 h nach Induktion wurden Proben genommen und die extrazellulären Proteine aus dem nach Zentrifugation erhaltenem zellfreien Überstand mittels Ammoniumsulfat gefällt, um die Produktion und Sekretion der hypothetischen PGAs zu überprüfen (Abbildung 16). Außerdem wurde 3, 6 und 22 h nach Induktion die PGA-Aktivität im zellfreien Überstand bestimmt (Abbildung 17). Zur Bestimmung der PGA-Aktivität wurde ein colorimetrischer Enzym-Assay, der sogenannte NIPAB-Assay, verwendet. Statt des natürlichen Substrates Penicillin G wird das synthetische Substrat 2-Nitro-5-[(phenylacetyl)amino]-benzoesäure (NIPAB) eingesetzt. Die PGAs spalten dieses Substrat, wodurch der Farbstoff 2-Nitro-5-aminobenzoesäure (NABA) freigesetzt wird. Aus der zeitabhängigen Steigung der Absorption bei 405 nm kann die Enzymaktivität berechnet werden.

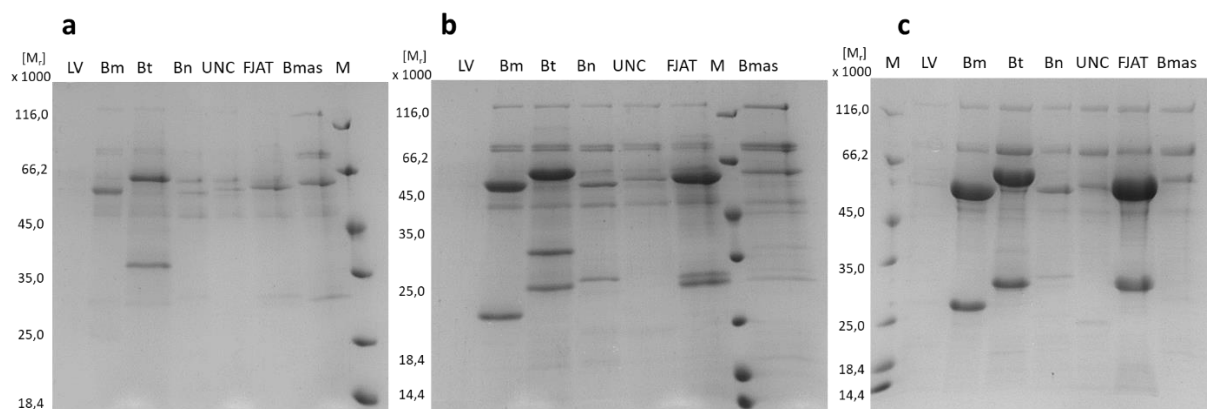


Abbildung 16: SDS-PAGE zur Analyse von rekombinant sekretierten PGAs. 3 h (a), 6 h (b) und 22 h (c) nach Induktion mit Xylose von rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen mit den Plasmiden zur Produktion der PGAs aus *B. megaterium* (Bm), *B. thermotolerans* (Bt), *B. niacini* (Bn), *B. sp.* UNC438CL73Tsus30 (UNC), *B. sp.* FJAT-27231 (FJAT), *B. massiliogorillae* (Bmas) und einer Leervektorkontrolle (LV) bei 37 °C und 220 rpm wurden die extrazellulären Proteine mittels Ammoniumsulfat aus 1,5 mL zellfreiem Überstand gefällt. Neben den gefällten extrazellulären Proteinen wurde der Proteinstandard Pierce™ Unstained Protein MW Marker von Thermo Scientific (M) aufgetragen.

Alle ausgewählten hypothetischen PGAs lagen laut SDS-Gel im zellfreien Medium als α - und β -Untereinheit mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 60.000 für die β -Untereinheit und 25.000

bis 30.000 für die α -Untereinheit vor (Abbildung 16). Dies entsprach etwa den berechneten Molekulargewichten der PGA-Untereinheiten der hypothetischen Proteine. Insgesamt werden von *B. megaterium* nur relativ geringe Mengen an Wirtsproteinen sekretiert, sodass die rekombinanten PGAs im Überstand schon mit hoher Reinheit vorliegen. Die erfolgreiche Sekretion dieser fünf neu identifizierten PGAs aus unterschiedlichen *Bacillus* spp. zeigte, dass die Signalpeptide dieser *Bacillus* spp. ebenfalls vom Sekretionsapparat von *B. megaterium* erkannt werden. Allerdings waren große Unterschiede in der Menge an sekretiertem Protein sichtbar. Während die PGAs aus *B. thermotolerans* (BtPGA) und *B. sp. FJAT-27231* (FJAT-PGA) ähnlich gut wie die bekannte PGA aus *B. megaterium* (BmPGA) sekretiert wurden, waren bei den PGAs aus *B. niacini* (BnPGA), *B. sp. UNC438CL73TsuS30* (UNC-PGA) und *B. massiliogorillae* (BmasPGA) nur schwache Proteinbanden im Überstand zu beobachten. Weiterhin war auffällig, dass die BtPGA bereits 3 h nach Induktion in größerer Menge sekretiert wurde als die restlichen PGAs. 6 h nach Induktion waren etwa ähnliche Mengen von FJAT-, Bt- und BmPGA im Überstand und 22 h nach Induktion überstiegen die sekretierten Proteinmengen von FJAT- und BmPGA die der BtPGA deutlich.

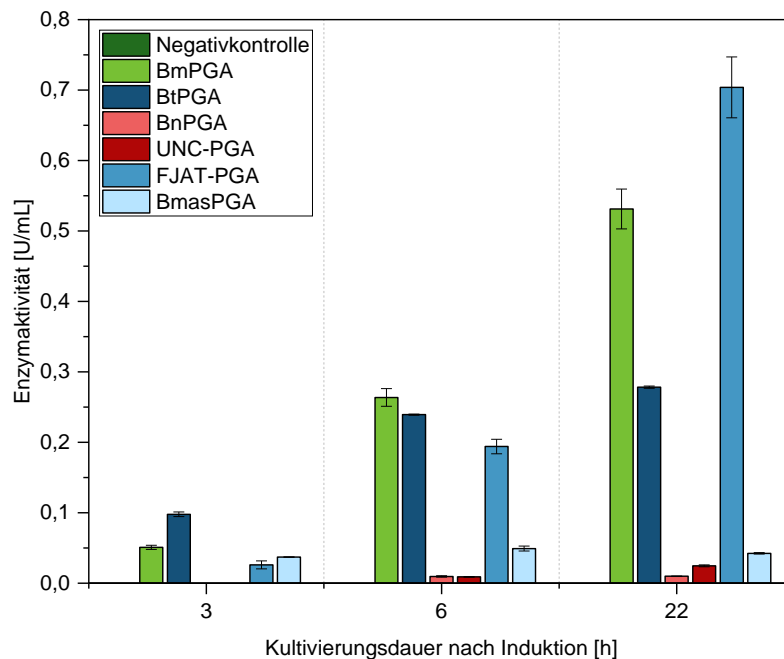


Abbildung 17: Volumetrische PGA-Enzymaktivität im zellfreien Überstand nach 3, 6 und 22 h Kultivierung nach Induktion bei 37 °C und 220 rpm von rekombinanten *B. megaterium* Stämmen mit den Plasmiden zur Produktion der PGAs aus *B. megaterium* (Bm), *B. thermotolerans* (Bt), *B. niacini* (Bn), *B. sp. UNC438CL73TsuS30* (UNC), *B. sp. FJAT-27231* (FJAT), *B. massiliogorillae* (Bmas) und einer Leervektorkontrolle. Der zellfreie Überstand wurde durch Zentrifugation gewonnen und im NIPAB-Assay in Dreifachbestimmung eingesetzt.

Die Beobachtungen spiegelten sich auch in der volumetrischen PGA-Aktivität im zellfreien Überstand wider (Abbildung 17). 3 h nach Induktion war die PGA-Aktivität im Überstand mit BtPGA mehr als doppelt so hoch wie bei Bm- und FJAT-PGA. 6 h nach Induktion wiesen die Überstände mit Bm-, Bt- und FJAT-PGA ähnliche PGA-Aktivitäten auf und 22 h nach Induktion hatte sich die PGA-Aktivität im BtPGA-Überstand im Vergleich zur 6 h-Probe kaum verändert, während sich die PGA-Aktivität im Überstand der BmPGA etwa verdoppelt und bei der FJAT-PGA sogar verdreifacht hatte. Möglicherweise ist die BtPGA im Überstand weniger stabil. Insgesamt passten die Ergebnisse der gefällten Proteinmenge und PGA-Aktivität sehr gut zusammen, nur 22 h nach Induktion schien die

Menge der BtPGA im SDS-Gel in etwa der Menge an BmPGA zu entsprechen, während die BtPGA-Aktivität nur halb so groß war wie die der BmPGA. Die Unterschiede der hier gemessenen volumetrischen Aktivitäten können auf eine unterschiedlich gute Sekretion oder unterschiedliche Aktivität der PGAs hindeuten. Durch zukünftige Reinigung und Bestimmung der spezifischen Aktivitäten kann dies weiter untersucht werden. Weil aber die Stärke der Banden im SDS-Gel und die volumetrische Aktivität insgesamt etwa entsprechend waren, wurde hier vermutet, dass sich die spezifischen Aktivitäten von FJAT-, Bt- und BmPGA ähneln. Nur die Aktivität der BtPGA schien etwas geringer zu sein. Da die BtPGA aus dem thermophilen Organismus *B. thermotolerans* stammt, wäre es möglich, dass die optimale Temperatur für eine Umsetzung deutlich höher liegt als bei der BmPGA. Dadurch könnte die Durchführung des NIPAB-Assays bei 37 °C zu einer niedrigeren BtPGA-Aktivität geführt haben. Die Parameter für den NIPAB-Assay wurden, wie in der Literatur für die BmPGA beschrieben, übernommen und beim Screening nicht auf die hier untersuchten PGAs optimiert (Yang et al. 2006).

Weiterhin zeigte sich, dass der Überstand der Negativkontrolle ohne PGA keine Aktivität aufwies, während in den Überständen mit Bn-, UNC- und BmasPGA geringe Aktivitäten von 2, 5 bzw. 8 % im Vergleich zur BmPGA-Aktivität bestimmt werden konnten. Es handelt sich also bei allen gewählten hypothetischen PGAs um sekretierbare, aktive PGA-Varianten. Die Bm-, Bt- und FJAT-PGAs wurden wegen der größeren Mengen an sekretiertem Protein mit hoher Reinheit im nächsten Schritt für eine direkte Reinigung aus dem Überstand genutzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Datenbanksuche zwei neue PGAs aus Gram-positiven Bakterien identifiziert werden konnten, die sich effizient mit *B. megaterium* produzieren und sekretieren ließen sowie eine deutliche Enzymaktivität aufwiesen.

4.2 Reinigung und Charakterisierung der neuartigen Penicillin G Acylasen

Bm-, Bt- und FJAT-PGA wurden von *B. megaterium* rekombinant mit nur geringeren Verunreinigungen durch Wirtsproteine sekretiert (Abbildung 16), weshalb angestrebt wurde, diese direkt durch Ionenaustauschchromatographie aus dem Kulturüberstand zu reinigen, um so das native Protein ohne Tag zu erhalten. Abhängig von der Nettoladung der Proteinoberfläche der PGAs bei unterschiedlichen pH-Werten können Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie zur Proteinreinigung verwendet werden. Daher wurden die isoelektrischen Punkte (pIs) der PGAs mithilfe des ExPASy compute pI/MW Tool berechnet. Ist der pH-Wert im umgebenden Medium bzw. im Puffer, der zur Reinigung verwendet wird, kleiner als der pI, ist die Nettoladung des Proteins positiv und die Kationenaustauschchromatographie kann zur Reinigung verwendet werden. Ist der pH-Wert im umgebenden Medium im umgekehrten Fall größer als der pI, ist die Nettoladung des Proteins negativ und die Anionenaustauschchromatographie wird zur Reinigung verwendet.

Für die FJAT-PGA lag der pI bei 8,28, sodass diese PGA durch Kationenaustauschchromatographie bei pH 5,5 gereinigt wurde. Für die BtPGA lag der errechnete pI bei 4,72, sodass die Anionenaustauschchromatographie bei pH 8 zur Reinigung verwendet wurde. Da der errechnete pI der BmPGA von 6,08 sowohl Anionen- als auch Kationenaustauschchromatographie theoretisch möglich macht, wurden beide Methoden getestet. Wegen der deutlich höheren Ausbeute und Reinheit

wurde die Kationenaustauschchromatographie für die BmPGA gewählt. Durch die Reinigung mittels der Ionenaustauschchromatographie konnten die PGAs aus dem Überstand deutlich konzentriert und von einigen verunreinigenden Wirtsproteinen getrennt werden. Die größte PGA-Menge aus 200 mL Kulturüberstand konnte von der FJAT-PGA gewonnen werden (Abbildung 18). Dies entsprach auch dem Ergebnis der Ammoniumsulfatfällung (Abbildung 16). Die Menge der gereinigten BtPGA war zwar etwas geringer, aber die Reinheit war im Vergleich zu FJAT- und BmPGA erhöht. Ein zusätzliches Protein mit einer Größe von 120 kDa tauchte hier im Gegensatz zu den Elutionsfraktionen von Bm- und FJAT-PGA nicht auf. Wahrscheinlich konnte dieses am Anionentauscher im Gegensatz zum Kationentauscher nicht binden. Bei der Reinigung der BmPGA war dieses 120 kDa-Protein ebenfalls in den Elutionsfraktionen sichtbar, konnte aber durch die Elution der BmPGA bei etwas geringeren NaCl-Konzentration (300 – 500 mM) im Vergleich zur FJAT-PGA weitestgehend von der BmPGA getrennt werden, da das 120 kDa-Protein besonders bei hohen NaCl-Konzentrationen eluierte (500 – 600 mM) (Abbildung 18).

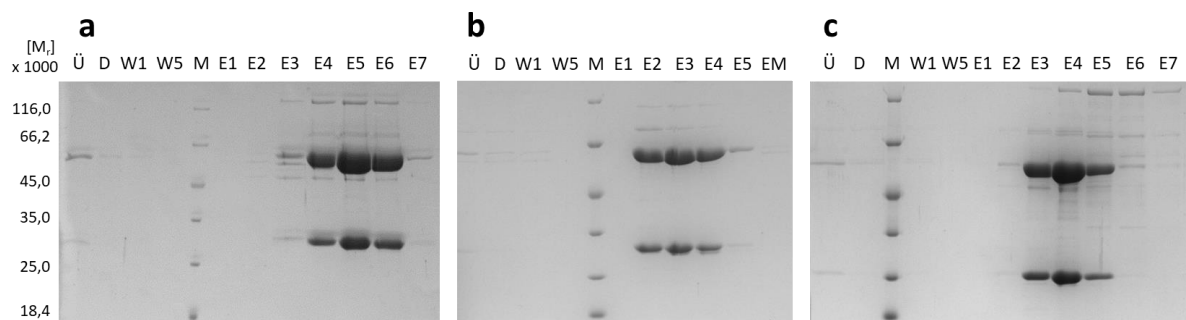


Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse der Reinigungen von FJAT-PGA (a), BtPGA (b) und BmPGA (c) durch Ionenaustauschchromatographie. *B. megaterium* mit den entsprechenden Plasmiden zur Produktion der PGA-Varianten wurde in jeweils 200 mL LB-Medium bei 37 °C kultiviert und der zellfreie Überstand durch Zentrifugation und Sterilfiltration erhalten. FJAT- und BmPGA wurden mit SP-Sepharose gereinigt und BtPGA mit Q-Sepharose. Alle Fraktionen wurden gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert: Kulturüberstand (Ü), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W), Marker (M, Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific), Elutionsfraktionen (E). Zur Elution wurde 50 mM Natriumphosphat (NaPh)-Puffer (pH 5,5) bei Verwendung von SP-Sepharose bzw. 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 8) bei Verwendung von Q-Sepharose jeweils mit 100 (E1) bis 700 mM NaCl (E7) bzw. 1 M (EM) benutzt.

Prognostizierte N-Termini von α - und β -Untereinheiten der PGAs nach Abspaltung des Signalpeptids und des Linkers wurden durch N-terminale Proteinsequenzierung verifiziert, wobei keine Heterogenität der Termini detektiert wurde.

Die größte Ausbeute konnte mit 30 mg/L_{Kultur} für die FJAT-PGA erreicht werden (Tabelle 26). Die Ausbeuten von BtPGA und BmPGA betrugen etwa 50 bzw. 70 % verglichen mit der Ausbeute der FJAT-PGA. Auch bei der Aktivität konnte unter den zunächst getesteten Bedingungen bei 37 °C und pH 7,5 für die Hydrolyse des Substratanalogons NIPAB für die FJAT-PGA mit 13,7 U/mg die höchste spezifische Aktivität der drei PGAs erzielt werden. Die spezifischen Aktivitäten von Bm- und BtPGA waren mit 12 bzw. 10,6 U/mg etwas geringer. Diese Ergebnisse entsprechen denen, die zuvor durch die Fällung und Bestimmung der volumetrischen Aktivität der PGAs erhalten wurden (Abbildung 16 und 17). Es wurde ebenfalls vermutet, dass die Menge der sekretierten PGAs bei der FJAT-PGA am größten war und die spezifische Aktivität der BtPGA bei 37 °C etwas geringer als die der anderen beiden PGAs, möglicherweise aufgrund eines höheren Temperaturoptimums, sein könnte.

Als Vergleich wurde außerdem eine PGA aus *E. coli* (EcPGA) von Sigma Aldrich im NIPAB-Assay eingesetzt. Dabei ergab sich eine deutlich geringere Aktivität von $(3,04 \pm 0,30)$ U/mg im Vergleich zu den rekombinant hergestellten PGAs aus *Bacillus* spp.

Tabelle 26: Ausbeuten und spezifische Aktivitäten von FJAT-, Bt- und BmPGA nach Ionenaustauschchromatographie.

	FJAT-PGA	BtPGA	BmPGA
Ausbeute [mg/L]	$30,21 \pm 3,76$	$14,83 \pm 0,92$	$20,57 \pm 1,75$
spezifische Aktivität* [U/mg]	$13,69 \pm 0,84$	$10,64 \pm 0,27$	$11,96 \pm 0,95$

* Die spezifische Aktivität wurde unter Standardbedingungen bei 37 °C und pH 7,5 mit dem Substratanalogon NIPAB bestimmt.

Die PGAs wurden bei einer Temperatur von 37 °C produziert, da dies für die bekannte BmPGA so beschrieben wurde (Yang et al. 2006). Rekombinante Proteine werden aber wegen möglicher Proteininstabilitäten oft bei niedrigeren Temperaturen produziert. Für andere PGAs wurde gezeigt, dass der optimale Temperaturbereich für die Produktion zwischen 24 und 30 °C lag (Rajendhran and Gunasekaran 2004). Daher wurde die Produktionstemperatur für die FJAT-PGA variiert (24, 30 und 37 °C) und die Ausbeute durch Reinigung mit Kationenaustauschchromatographie bestimmt (Anhang, Abbildung 73). Dabei zeigte sich, dass die produzierte Proteinmenge mit steigender Produktionstemperatur sogar zunahm.

Um zu überprüfen, ob die PGAs bei 24-stündiger Produktion bei 37 °C stabil waren, wurde die Aktivität von Bm-, Bt- und FJAT-PGA direkt nach der Reinigung bestimmt. Anschließend wurden die gereinigten PGAs für 24 h bei 37 °C gelagert und die Aktivität erneut bestimmt. Dabei zeigte sich, dass alle Enzyme ihre Aktivität nahezu beibehielten. Bei der FJAT-PGA war kein Unterschied detektierbar, bei Bm- und BtPGA kam es zu einer geringfügigen Abnahme der spezifischen Aktivität von bis zu 5 %, sodass 37 °C als Produktionstemperatur beibehalten wurde.

Als nächstes wurde die Lagerstabilität der drei gereinigten PGAs bei Raumtemperatur, bei 4 °C und bei -18 °C getestet. Bei der Lagerung bei -18 °C wurde 5 % (v/v) Glycerin als Cryokonservierung zugegeben (Carpenter and Crowe 1988). Gemessen wurde die volumetrische Enzymaktivität direkt nach der Reinigung und nach Lagerung der gleichen Enzymlösung über 3, 7, 14 und 28 Tage. Dabei zeigte sich, dass die Enzyme bei allen Temperaturen über vier Wochen sehr stabil waren (Abbildung 19). Erstaunlicherweise zeigten alle PGAs bei Lagerung bei Raumtemperatur nach vier Wochen noch etwa 75 % der ursprünglichen Aktivität. Bei -18 °C war der Aktivitätsverlust über die Zeit ähnlich. Dabei könnte das Einfrieren und Auftauen ein Grund für den Verlust der Aktivität sein. Als beste Lagerung ergab sich aus diesen Ergebnissen für alle PGAs die Lagerung bei 4 °C mit Aktivitäten von 91 % (BtPGA), 92 % (FJAT-PGA) bis zu keiner Abnahme (BmPGA) im Vergleich zu den Ausgangsaktivitäten.

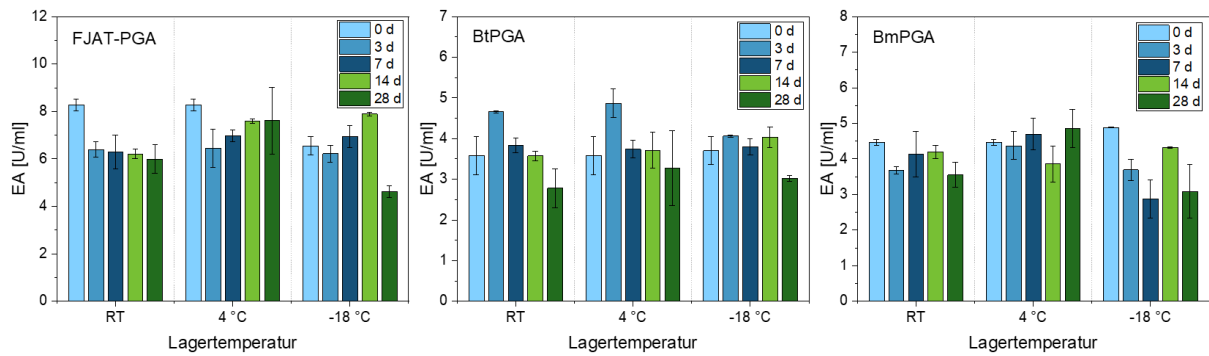


Abbildung 19: Volumetrische Enzymaktivität (EA) von FJAT-, Bt- und BmPGA bei Lagerung bei Raumtemperatur (RT), 4 °C und -18 °C über 28 Tage. Bei Lagerung bei -18 °C wurden 5 % (v/v) Glycerin zugegeben. Es wurden direkt nach der Reinigung erhaltene PGA-Lösungen eingesetzt und gelagert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mittels NIPAB-Assay in Doppelbestimmung.

Anschließend wurde die thermische Stabilität der drei PGAs ermittelt. Mithilfe des Thermal Shift Assays wurde dazu die Schmelztemperatur, bei welcher die gereinigten PGAs durch Hitze denaturieren, bestimmt. Dabei wurde die Denaturierung der Enzyme über eine Zunahme der Fluoreszenz eines Farbstoffs gemessen, der an hydrophobe Aminosäurereste bindet, die während der Entfaltung durch Hitze freigelegt werden. Der temperaturabhängige Verlauf der Fluoreszenz ergab die Schmelzkurven der PGAs (Abbildung 20a). Die Schmelztemperatur ließ sich als das Minimum der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurve ermitteln (Abbildung 20b).

Die BmPGA zeigte mit $(56,77 \pm 0,24) ^\circ\text{C}$ eine für ein mesophiles Bakterium wie *B. megaterium* unerwartet hohe Schmelztemperatur. Die BtPGA wies mit $(64,50 \pm 0,24) ^\circ\text{C}$ eine noch höhere Schmelztemperatur auf. Da die BtPGA aus dem thermophilen Bakterium *B. thermotolerans* stammt, entsprach diese höhere Thermostabilität den Erwartungen. Die weitaus höchste Thermostabilität zeigte die FJAT-PGA mit $(73,31 \pm 0,29) ^\circ\text{C}$, wobei das bisher unklassifizierte Bakterium *B. sp. FJAT-27231* nicht als thermophil bekannt ist.

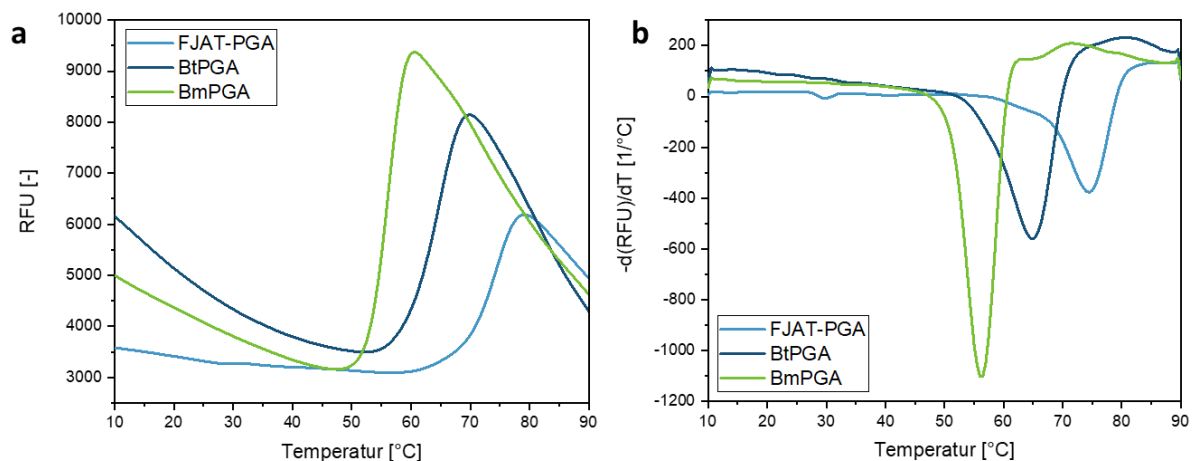


Abbildung 20: Thermal Shift Assay zur Bestimmung der Schmelztemperaturen von FJAT-, Bt- und BmPGA. a) Schmelzkurve. b) negative erste Ableitung der Schmelzkurve. RFU = Relative Fluoreszenzeinheit (engl. relative fluorescence unit). Zur Bestimmung der Schmelzkurven wurde gereinigte FJAT-, Bt- und BmPGA mit einer Konzentration von jeweils 2 mg/mL im Thermal Shift Assay eingesetzt.

Dies zeigte, dass die Suche nach neuen Enzymen aus anderen Spezies einen sehr vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung von Enzymeigenschaften darstellen kann. So konnte durch Identifikation der FJAT-PGA eine um 17 °C gesteigerte Schmelztemperatur im Vergleich zur BmPGA erzielt werden. Diese

insgesamt hohen Thermostabilitäten bestätigen auch die stabile Produzierbarkeit bei 37 °C und die gute Lagerstabilität. Die hohe thermische Stabilität der PGAs könnte aufgrund ihres Vorkommens in der extrazellulären Umgebung einen Vorteil für das Überleben der Wirtsstämme in verschiedenen Lebensräumen bieten. Durch Verwendung thermostabiler Enzyme in industriellen Prozessen kann deren Effizienz und Produktivität verbessert werden, da Reaktionen bei höheren Temperaturen mit erhöhter Geschwindigkeit ablaufen können (Vogt and Argos 1997). Wodurch die hohe thermische Stabilität vor allem der FJAT-PGA vermittelt wird, ist bisher unklar. In der Literatur sind einige Studien zur Untersuchung der Thermostabilität publiziert, die beispielsweise gleichartige Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen untersucht haben. Dabei konnten Trends, wie das vermehrte Auftreten von Ionenpaaren und Wasserstoffbrücken in thermophilen Proteinen festgestellt, aber keine gesicherten Regeln abgeleitet werden (Szilágyi and Závodszky 2000). Im Fall der PGA ließen Vergleiche der Aminosäuresequenzen von PGAs aus mesophilen Organismen keine eindeutigen Schlüsse zu. Möglicherweise ergeben sich zur Erklärung der Thermostabilität von FJAT-, Bt- und BmPGA weitere Ansatzpunkte aus der Enzymstruktur. Beispielsweise unterscheidet sich die Oberflächenladung der PGAs, wie sich aus den pls ableiten lässt. Die thermostabile FJAT-PGA ist bei pH 7 eher positiv geladen und BtPGA negativ, während die weniger thermostabile BmPGA sowohl negative als auch positive Ladungen aufweist (siehe auch Abbildung 29). Die unterschiedlichen Oberflächenladungen haben möglicherweise einen Einfluss auf die Thermostabilität.

Zur weiteren Untersuchung der Thermostabilität der PGAs wurde die Aktivität bei 37 °C anhand der Hydrolyse des Substratanalogons NIPAB nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen zwischen 50 und 75 °C bestimmt, um zu überprüfen, bis zu welcher Temperatur die PGAs verwendet werden können und noch katalytisch aktiv sind (Abbildung 21).

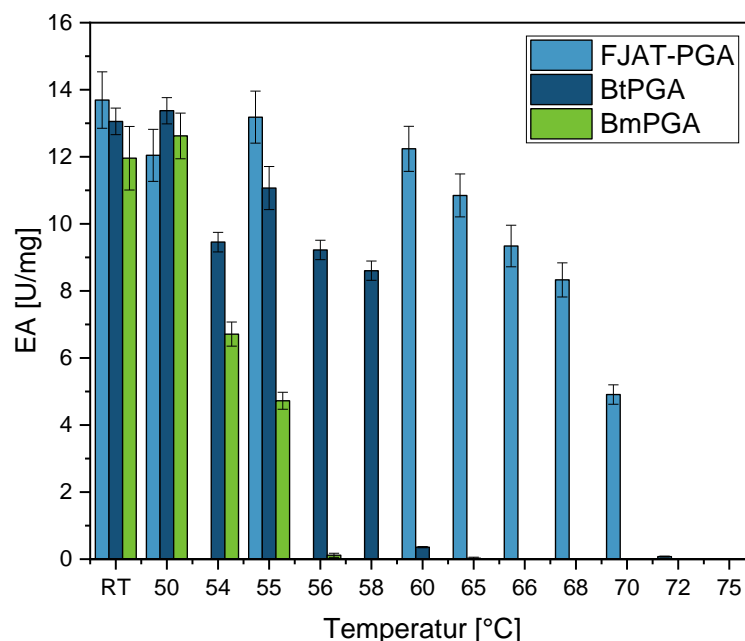


Abbildung 21: Bestimmung der spezifischen NIPAB-Hydrolyse-Aktivität von FJAT-, Bt- und BmPGA nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen zwischen 50 und 75 °C. Als Kontrolle wurden die Enzyme für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Es wurde gereinigtes Enzym verwendet. Der NIPAB-Assay wurde nach der einstündigen Inkubation im Tecan-Reader bei 37 °C und pH 7,5 in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Dabei bestätigten sich die Messungen aus dem Thermal Shift Assay. Die FJAT-PGA war noch nach Inkubation bei Temperaturen von bis zu 70 °C aktiv, während Bt- und BmPGA nur bis 58 bzw. 55 °C aktiv waren, was immer noch einer vergleichsweise hohen Proteinstabilität entspricht (Ku et al. 2009). Bei der FJAT-PGA war die Aktivität bei einer einstündigen Inkubation bis zu einer Temperatur von 60 °C stabil. Nach Inkubation bei höheren Temperaturen begann die Aktivität, gemessen im Standardassay bei 37 °C, zu sinken. Nach Inkubation bei 70 °C waren noch etwa 35 % der Ausgangsaktivität nachweisbar, bis nach einstündiger Inkubation bei 72 °C fast keine Aktivität mehr vorhanden war. Die Aktivitäten von Bt- und BmPGA waren bereits nach Inkubation bei 54 °C abgesunken (Abbildung 21). Insgesamt lagen die Temperaturen, bei denen die PGAs keine Aktivität mehr zeigten, etwa 2 bis 4 °C unter den ermittelten Schmelzpunkten, bei welchen die Enzyme bereits denaturiert waren.

Da eine einstündige Inkubation keine Rückschlüsse auf die Langzeitstabilität der PGAs zuließ, wurde weiterhin untersucht, wie sich die Enzymaktivität nach einer längeren Inkubation bei einer ausgewählten erhöhten Temperatur verändert und die Halbwertszeiten für diese ausgewählten Bedingungen bestimmt. Zunächst wurde die Aktivität nach Inkubation bei 68 °C (FJAT-PGA), 56 °C (BtPGA) bzw. 52 °C (BmPGA) in einem Zeitraum von 8 h untersucht. Die PGA-Aktivität, gemessen bei 37 °C, nahm mit fortschreitender Inkubationsdauer bei den gewählten Temperaturen ab (Abbildung 22a). Es wurde eine Kinetik 1. Ordnung angenommen und zur Berechnung der Halbwertszeit die folgenden Formeln für die Kinetik 1. Ordnung verwendet:

$$[A] = [A_0] * e^{-kt}, \text{ durch } [A] = \frac{1}{2} [A_0] \text{ ergibt sich } t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k}$$

Die Konzentration $[A]$ wird hierbei durch die Enzymaktivität repräsentiert, welche auch als aktive Enzymkonzentration gesehen werden kann. $[A_0]$ ist die Anfangsaktivität, k die Geschwindigkeitskonstante und t die Zeit. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ergibt sich, wenn nur noch die halbe Aktivität erreicht wird. Die zur Berechnung der Halbwertszeit nötige Geschwindigkeitskonstante k ergibt sich als Betrag der Steigung bei Auftragung vom natürlichen Logarithmus der Aktivität gegen die Zeit (Abbildung 22b).

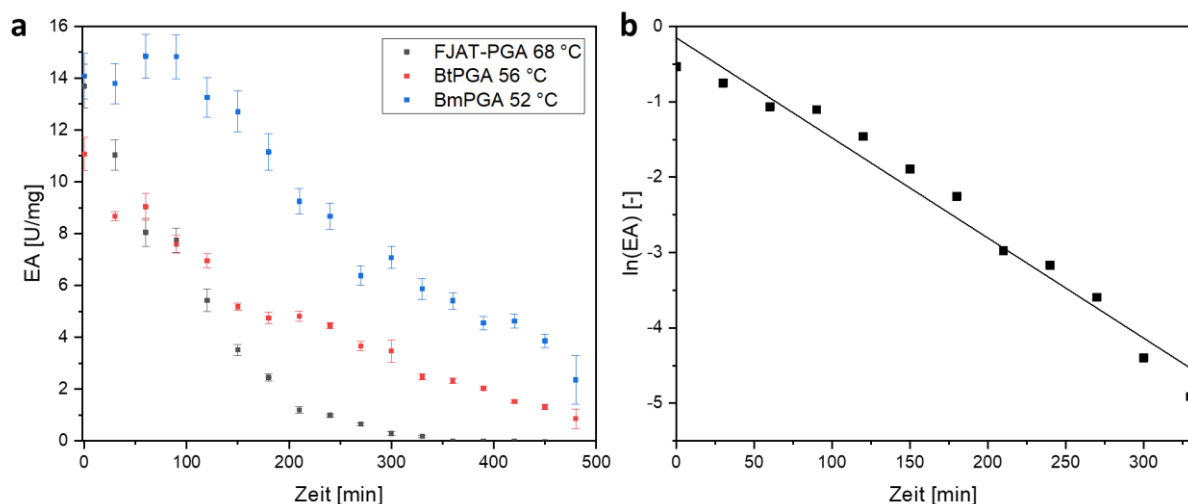


Abbildung 22: a) Bestimmung der Enzymaktivität (EA) nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (FJAT-PGA 68 °C, BtPGA 56 °C und BmPGA 52 °C) über einen Zeitraum von 480 min. Nach der Inkubation wurde der NIPAB-Assay im Tecan-Reader bei 37 °C und pH 7,5 in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes Enzym verwendet. b) Natürlicher Logarithmus der Enzymaktivität über die Zeit der FJAT-PGA bei 68 °C mit linearer Anpassung zur Bestimmung der Halbwertszeit.

Mithilfe der grafisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten konnten die Halbwertszeiten für die FJAT-PGA bei 68 °C mit 52,21 min, für die BtPGA bei 56 °C mit 145,01 min und für die BmPGA bei 52 °C mit 195,86 min berechnet werden (Tabelle 27).

Tabelle 27: Geschwindigkeitskonstanten k und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ von FJAT-PGA bei 68 °C, BtPGA bei 56 °C und BmPGA bei 52 °C.

	T [°C]	$k = \text{Steigung} $	$t_{1/2}$ [min]
FJAT-PGA	68	0,0133	52,21
BtPGA	56	0,0048	145,01
BmPGA	52	0,0035	195,86

Für die FJAT-PGA ergab sich mit 52 min bei 68 °C die kleinste Halbwertszeit, allerdings bei deutlich höherer Temperatur als bei den anderen beiden PGAs. Die Halbwertszeiten für Bt- und BmPGA bei den jeweils untersuchten Bedingungen bei 56 bzw. 52 °C waren drei- bzw. viermal so lang. Die in der Literatur als mittelmäßig thermostabil beschriebenen PGAs aus *A. faecalis*, *B. badius* bzw. *Achromobacter xylosoxidans* hatten bei 55 °C eine Halbwertszeit von 15 min, 20 min bzw. 55 min (Torres et al. 2013). Damit sind Bt- und FJAT-PGA deutlich thermostabiler als diese PGAs.

Allerdings sind auch Halbwertszeiten von bis zu 200 min für die Anwendung in einem biokatalytischen Prozess noch zu gering. Abhängig von der Prozessführung (z. B. Batch- oder kontinuierliche Kultivierung) und Anzahl der Zyklen bei Wiederverwendung von immobilisiertem Enzym kann die Prozessdauer von wenigen Tagen bis vielen Wochen liegen (Chmiel 2011; Basso and Serban 2019). Deshalb müsste für die Anwendung eine niedrige Temperatur gewählt werden, um die Halbwertszeit deutlich zu erhöhen. Da die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Temperatur steigt, muss die optimale Prozesstemperatur so gewählt werden, dass die Aktivität möglichst hoch ist, aber die Stabilität über die Einsatzdauer gewährleistet ist (Chmiel 2011). Dazu sollte auch das Temperaturoptimum der PGAs beachtet werden. Deshalb wurde die Hydrolyse von NIPAB durch die PGAs in einer beheizbaren Quarzküvette bei Temperaturen zwischen 37 und 80 °C untersucht. Als Temperaturoptima ergaben sich für die FJAT-PGA 70 °C und für die BtPGA sowie BmPGA 55 °C (Abbildung 23). Bei der FJAT-PGA konnte die Aktivität durch Erhöhung der Reaktionstemperatur von 37 auf 65 °C bzw. 70 °C auf das doppelte gesteigert werden. Auch bei der BtPGA bewirkte die Temperaturerhöhung auf 55 °C fast eine Verdopplung der Aktivität im Vergleich zu 37 °C. Bei der BmPGA war die Steigerung geringer, weil die Aktivität bei 37 °C schon sehr hoch war. Obwohl Bt- und BmPGA mit etwa 55 °C das gleiche Temperaturoptimum aufwiesen, zeigte die BtPGA noch bei Temperaturen bis zu 70 °C Aktivität, während bei der BmPGA nur bis 60 °C Aktivität nachweisbar war. Dies lag an der niedrigeren Schmelztemperatur der BmPGA von nur 56,8 °C (BtPGA 64,5 °C). Auffällig war weiterhin, dass alle PGAs in diesem Test noch oberhalb der bestimmten Schmelztemperatur Aktivität zeigten. Die Enzymlösung wurde jeweils nur 3 – 5 min bis zum Erreichen der angegebenen Temperatur inkubiert, sodass vermutlich noch nicht alle Enzymmoleküle in der Lösung direkt denaturiert waren. Die teilweise Denaturierung führte auch zu größeren Abweichungen bei den Messungen bei hohen Temperaturen.

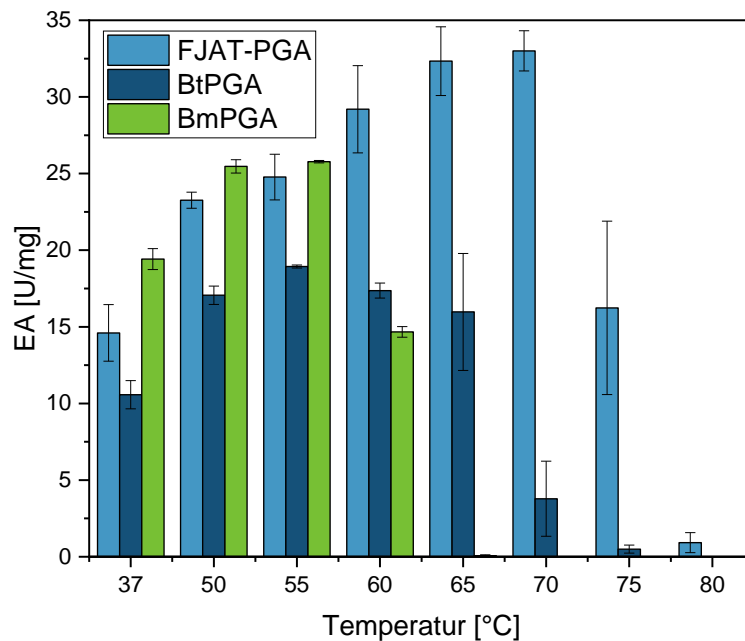


Abbildung 23: Bestimmung der spezifischen NIPAB-Hydrolyse-Aktivität von FJAT-, Bt- und BmPGA bei verschiedenen Temperaturen. Es wurde gereinigtes Enzym verwendet. Der Test wurde im UV-VIS-Spektrometer Jasco V-650 bei Temperaturen zwischen 37 und 80 °C in Doppelbestimmung durchgeführt.

Bei der bereits gut charakterisierten EcPGA lag das Temperaturoptimum in der Literatur mit 40 bis 50 °C weit unter den hier untersuchten PGAs (Adikane and Thakar 2010; Torres et al. 2013). Dies zeigt, dass sich besonders die FJAT-PGA für eine Anwendung eignen würde, da sie bei höheren Temperaturen eingesetzt werden kann und hohe Hydrolyse-Aktivitäten zeigt. Bei einer weiteren PGA aus *K. citrophila* lag das Temperaturoptimum wie bei Bt- und BmPGA bei 55 °C (Wen et al. 2004).

Die Temperaturoptima befanden sich meist nah am Punkt der thermischen Denaturierung, da sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur deutlich erhöht. Allerdings ist ein Enzym bei hohen Temperaturen meist nur sehr kurz stabil, weshalb über die Aktivität bei verschiedenen Temperaturen und die Halbwertszeit, als Maß für die zeitabhängige Enzymstabilität bei der entsprechenden Temperatur, eine gute Balance zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Langzeitstabilität gefunden werden kann.

Die meisten bisher beschriebenen PGAs zeigen deutlich geringere Temperaturoptima und thermische Stabilität als die FJAT-PGA. Noch höhere thermische Stabilitäten konnten nur bei Penicillin Acylasen gefunden werden, die aromatische Penicilline wie Penicillin G kaum umsetzen, sondern für Penicilline mit aliphatischen Seitenketten wie Penicillin K spezifisch sind. So zeigte die Penicillin Acylase aus *Thermus thermophilus* eine Halbwertszeit von 9,2 h bei 75 °C (Torres et al. 2013). Da diese Penicillin Acylasen Penicillin G und andere aromatische β -Lactam-Antibiotika aber nicht umsetzen können, scheint die FJAT-PGA eine vielversprechende Alternative zur oft eingesetzten EcPGA zu sein.

Weiterhin wurde das pH-Wert Optimum der PGAs bestimmt. Dazu wurde das Substratanalogon NIPAB in verschiedenen Puffern mit pH-Werten zwischen 4 und 9,5 gelöst und der colorimetrische Aktivitätsassay bei 37 °C durchgeführt (Abbildung 24). Die bestimmten pH-Optima lagen für FJAT- und BtPGA bei pH 8 und für BmPGA bei pH 8,5. Obwohl die pH-Optima der drei PGA relativ ähnlich waren, sahen die Verteilungen unterschiedlich aus. Während die FJAT-PGA von pH 6 bis 8 und die BmPGA von pH 7,5 bis 9,5 eine hohe Aktivität zeigten, fiel die Aktivität bei der BtPGA unter pH 7,5 oder über pH 8

schnell ab. Auch die weiteren bekannten PGAs wiesen ähnliche pH-Optima auf. Die EcPGA hat beispielsweise ein pH-Optimum von 8 bis 8,5 (Balasingham et al. 1972) und die PGA aus *K. citrophila* eines von 8,5 (Wen et al. 2004).

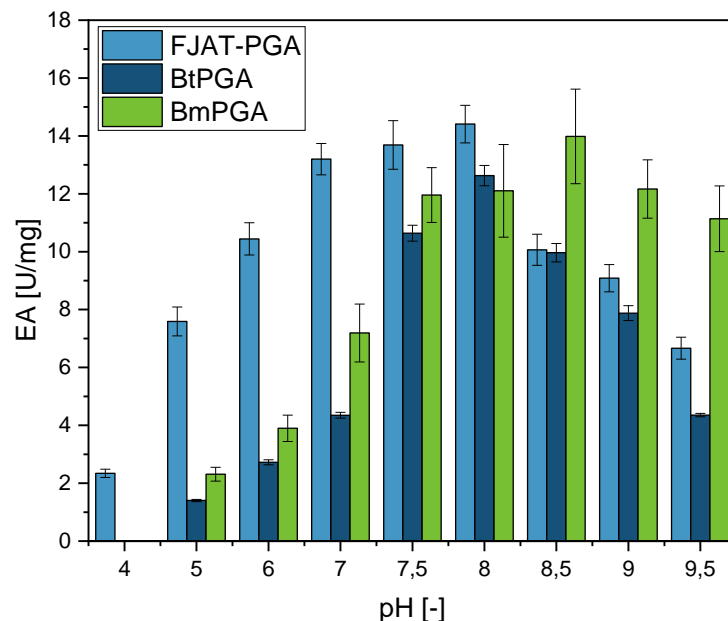


Abbildung 24: Bestimmung der spezifischen NIPAB-Hydrolyse-Aktivität von FJAT-, Bt- und BmPGA bei verschiedenen pH-Werten. Es wurde gereinigtes Enzym verwendet. Der NIPAB-Assay wurde im Tecan-Reader bei 37 °C in Dreifachbestimmung durchgeführt. Folgende Puffer wurden mit einer Konzentration von 50 mM verwendet: Natrium-Acetat (pH 4), Natrium-Citrat (pH 5), MES (pH 6), HEPES (pH 7), Natrium-Phosphat (pH 7,5), Tris-HCl (pH 8 bis 9,5).

Weiterhin zeigte sich, dass mit dem standardmäßig verwendeten Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 7,5 für alle drei PGAs relativ hohe Aktivitäten gemessen werden konnten. Durch Anpassung des pH-Wertes konnte die jeweilige PGA-Aktivität zwischen 5,3 % (FJAT-PGA) und 18,7 % (BtPGA) gesteigert werden. Bei Messung der Aktivität bei den jeweils angepassten pH-Werten könnten sich auch die zuvor dargestellten Ergebnisse leicht verändern.

4.3 Kristallstrukturen der PGAs aus *Bacillus species* FJAT-27231, *Bacillus thermotolerans* und *Bacillus megaterium*

Vor dem Start dieser Arbeit wurde noch keine Kristallstruktur einer PGA aus Gram-positiven Organismen veröffentlicht, obwohl die Kristallisation der BmPGA bereits gelang und auch ein Beugungsmuster aufgenommen werden konnte (Rojviriya et al. 2011). Um in dieser Arbeit die Strukturen der BmPGA, BtPGA und FJAT-PGA als erste Strukturen von PGAs aus Gram-positiven Bakterien zu lösen, wurden die PGAs nach der Ionenaustauschchromatographie mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt, um die für die Kristallisation nötige Reinheit zu erhalten. Bei der beispielhaft dargestellten SDS-PAGE-Analyse der BtPGA waren die α - und β -Untereinheit bei 30 und 60 kDa in hoher Konzentration bei nur sehr geringer Anzahl und Menge anderer Proteine sichtbar (Abbildung 25).

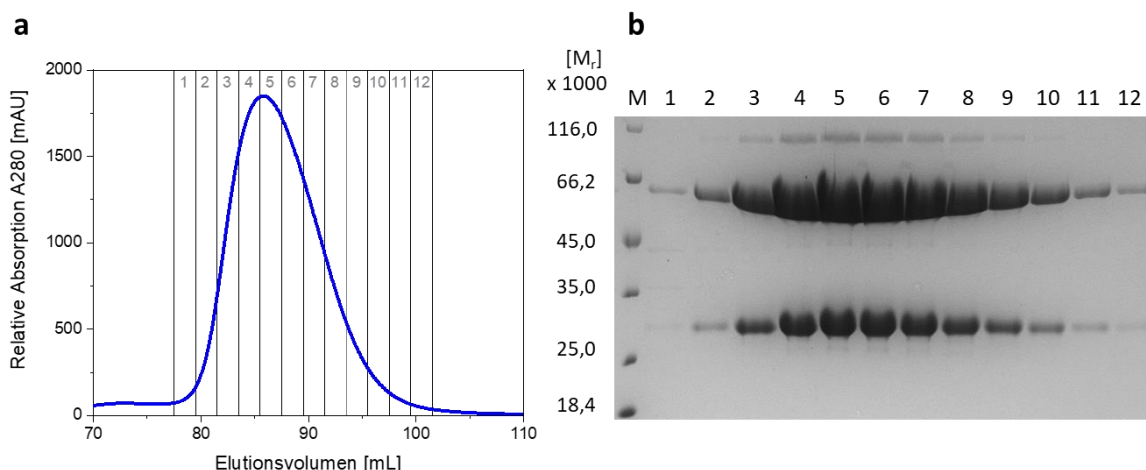


Abbildung 25: Größenausschlusschromatographie der PGA aus *B. thermotolerans* (BtPGA). Nach der Ionenaustauschchromatographie wurden die proteinenthaltenden Fraktionen vereinigt und auf etwa 10 mg/mL konzentriert. Die Proteinlösung wurde über eine HiLoad 26/600 Superdex 75 PG Säule gereinigt. a) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Die Protein-elution wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm überwacht. b) SDS-PAGE Analyse der Elutionsfraktionen, M = Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific.

Anschließend wurden die drei gereinigten PGAs auf 10 mg/mL konzentriert und Screeningexperimente durchgeführt, um geeignete Bedingungen zum Erhalt von Kristallen zu ermitteln. Trotz der hohen Sequenzidentität von 71 bis 75 % wurden für BmPGA, BtPGA und FJAT-PGA sehr unterschiedliche Kristallisationsbedingungen identifiziert und verschiedene Kristallformen erhalten (Abbildung 26).

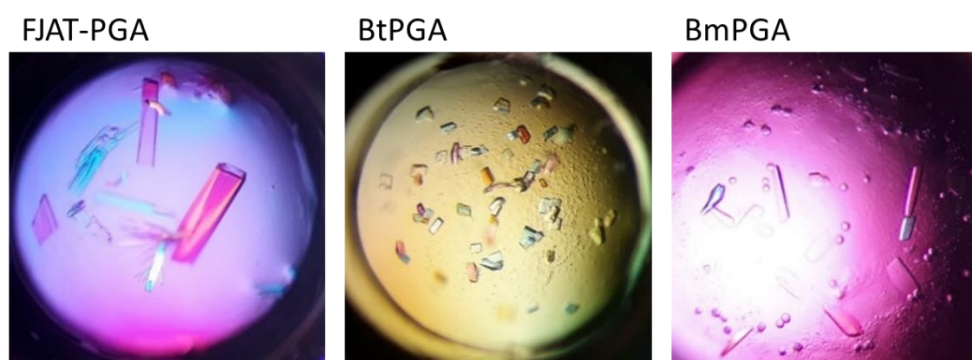


Abbildung 26: Kristalle der FJAT-PGA (links), BtPGA (Mitte) und BmPGA (rechts). Die Kristalle sind im Sitting-Drop Dampfdiffusionsverfahren unter den folgenden Pufferbedingungen bei 17 °C entstanden: 85 mM HEPES (pH 7,5), 8,5 % (w/v) PEG 8000, 15 % (v/v) Glycerin (FJAT-PGA); 18 mM Calciumchlorid, 90 mM Natriumacetat (pH 4,6), 27 % (v/v) MPD, 10 % (v/v) Glycerin (BtPGA) und 200 mM Magnesiumchlorid, 20 % (w/v) PEG 3350 (BmPGA).

Die FJAT-PGA Kristalle zur Strukturaufklärung wurden aus der Bedingung 85 mM HEPES (pH 7,5), 8,5 % (w/v) PEG 8000 und 15 % (v/v) Glycerin erhalten. Die BtPGA-Kristalle entstanden in einer Lösung mit 18 mM Calciumchlorid, 90 mM Natriumacetat (pH 4,6), 27 % (v/v) MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol) und 10 % (v/v) Glycerin und BmPGA-Kristalle wurden in 200 mM Magnesiumchlorid mit 20 % (w/v) PEG 3350 erhalten. Die vorher in der Literatur beschriebenen BmPGA-Kristalle wurden in 27 % (w/v) PEG 4000, 200 mM CaCl_2 , 100 mM Imidazol bei pH 6,5 erhalten (Rojviriya et al. 2011) und hatten eine ähnliche Plättchenform wie die hier gezeigten BmPGA-Kristalle (Abbildung 26). Die Aufnahme der Beugungsdaten und die Strukturaufklärung wurde in Kooperation mit Dr. Jan Pippel und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig). Die Struktur der FJAT-PGA konnte mit einer Auflösung von 1,36 Å gelöst werden. Die untersuchten Kristalle waren orthorhombisch und gehörten zur

Raumgruppe $P2_12_12_1$. Für die BtPGA-Kristalle wurde eine Auflösung von 2 Å erzielt. Diese waren hexagonal und gehörten zur Raumgruppe H3. Die monoklinischen BmPGA-Kristalle entsprachen der Raumgruppe $P2_1$. Da das Beugungsmuster für BmPGA sehr anisotrop war, konnte nur eine Auflösung zwischen 2,2 und 3 Å erreicht werden. Wegen des anisotropen Verhaltens, welches bereits früher bei der BmPGA festgestellt werden konnte (Rojviriya et al. 2011), wurde der Beugungsdatensatz mit dem STARANISO-Webserver (Tickle et al. 2018) reduziert. Dabei wurde eine ellipsoidale Obergrenze der Daten bestimmt, sodass nur signifikante Beugungsdaten für die folgenden Schritte der Strukturaufklärung genutzt wurden.

Die Strukturen wurden nach der Methode des „Molecular Replacement“ gelöst. Dazu wurde für die FJAT-PGA die Struktur der PGA aus *Providencia rettgeri* (PDB 1CP9) (McDonough et al. 1999) als Modell genutzt, weil diese mit ungefähr 34 % die größte Sequenzidentität der bereits gelösten Strukturen mit der Sequenz der FJAT-PGA aufwies. Durch manuelle Verfeinerung in Coot (Emsley et al. 2010) und Computer-basierte Optimierung mit phenix.refine (Afonine et al. 2012) konnte ein Modell mit sehr guter Geometrie und guten R-Faktoren erhalten werden. Mithilfe der Elektronendichte konnten die Positionen der Aminosäurereste 2 - 204 der α -Untereinheit und die Reste 1 - 527 der β -Untereinheit bestimmt werden. Durch ihre Flexibilität und damit diffuse Elektronendichte konnten acht C-terminale Aminosäurereste der α -Untereinheiten und elf C-terminale Aminosäurereste der β -Untereinheiten nicht genau bestimmt werden. Eine Rest-Elektronendichte im aktiven Zentrum deutete auf das Vorhandensein eines nicht eindeutig identifizierten Liganden hin. Die Abmessungen wiesen ähnliche Ausmaße wie das im Kristallisationspuffer enthaltene HEPES auf (Abbildung 27). Allerdings führte der Einbau von HEPES entsprechend der Elektronendichte in das vorliegende Modell zu ungünstigen Interaktionen, weshalb die entsprechende Position im endgültigen Modell unbesetzt blieb (Mayer et al. 2019). Weiterhin lagen in der FJAT-PGA-Struktur zwei gebundene Calcium-Ionen vor. Eines davon ist in der gleichen Position gebunden wie bei den PGAs aus *E. coli* (Duggleby et al. 1995), *P. rettgeri* (McDonough et al. 1999) und *A. faecalis* (Varshney et al. 2012) und hat wahrscheinlich eine strukturelle Funktion.

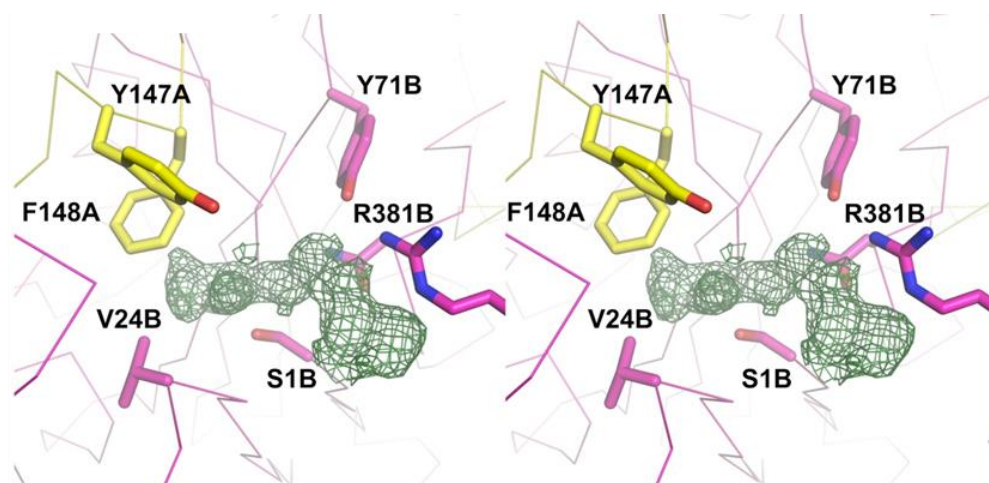


Abbildung 27: 2,5σ-|Fo-Fc|-Differenz-Elektronendichte eines nicht identifizierten Liganden in der FJAT-PGA-Kristallstruktur (Cross-eyed Stereoplot). Zu beachten ist die potentielle Wechselwirkung mit β R381 (R381B). Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit ihrer Position bezeichnet. A oder B steht für die Zugehörigkeit zur α - oder β -Untereinheit. Diese Abbildung wurde, wie die folgenden molekularen Darstellungen, mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) erstellt. Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jan Pippel und Prof. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig). Modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Für die Lösung der Strukturen von Bt- und BmPGA wurde die FJAT-PGA-Struktur als Modell für die „Molecular Replacement“-Methode verwendet. Das Strukturmodell der BtPGA konnte mit den gleichen Methoden wie das der FJAT-PGA erstellt werden. Mithilfe der Elektronendichte konnten die Positionen der Aminosäurereste 7 - 197 der α -Untereinheit und die Reste 1 - 536 der β -Untereinheit bestimmt werden. Durch ihre Flexibilität konnten sechs N-terminale und 15 C-terminale Aminosäurereste der α -Untereinheiten nicht genau bestimmt werden, am C-Terminus der β -Untereinheit konnten nur zwei C-terminale Aminosäurereste nicht genau bestimmt werden. Zusätzlich zu den zwei strukturellen Ca^{2+} -Ionen, die auch in der FJAT-Struktur sowie teilweise in PGAs aus Gram-negativen Bakterien an den gleichen Positionen binden, enthielt die gelöste BtPGA-Struktur einige weitere Ca^{2+} -Bindestellen. Dies erklärt auch die Notwendigkeit von CaCl_2 im Kristallisationspuffer für die BtPGA. Auch im Modell der BtPGA deutete die zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum wie bei der FJAT-PGA auf das Vorhandensein eines Liganden hin, der ebenfalls nicht modelliert werden konnte und deshalb nicht im endgültigen Modell auftaucht.

Auch die Struktur der BmPGA konnte trotz der Anisotropie des Beugungsmusters zu einem zufriedenstellenden Modell verfeinert werden. Mithilfe der Elektronendichte konnten die Positionen der Reste 3 - 195 der α -Untereinheit und die Reste 1 - 527 der β -Untereinheit bestimmt werden. Es konnten 16 C-terminale Aminosäurereste der α -Untereinheiten und zehn C-terminale Reste der β -Untereinheiten nicht genau bestimmt werden. Das aktive Zentrum der BmPGA zeigte keine zusätzliche Elektronendichte, was allerdings auch mit der schlechteren Auflösung der Beugungsdaten zusammenhängen könnte. In der Struktur der BmPGA waren wie bei der FJAT- und BtPGA zwei Ca^{2+} -Ionen in der Struktur gebunden. Diese befanden sich bei allen drei hier vorgestellten Strukturen an den gleichen Positionen und haben damit wahrscheinlich beide eine strukturelle Funktion. Alle Parameter zur Datensammlung und Verfeinerung sind im Anhang gezeigt (Tabelle 36) (Mayer et al. 2019).

Es konnten somit erstmals Strukturen von drei PGAs aus Gram-positiven Bakterien gelöst werden. Diese sind mit den Codes 6NVX (FJAT-PGA), 6NVY (BtPGA) und 6NVW (BmPGA) in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt. Die drei Strukturen sind sich untereinander sehr ähnlich. Sie überlagern sich mit RMSD-Werten (Mittleres Abweichungsquadrat der Atompositionen, engl. root mean square deviation) zwischen nur 0,62 und 0,84 Å. Die RMSD-Werte beschreiben, wie weit die einzelnen C_α -Positionen der in einem Struktur-Alignment ausgerichteten Enzymstrukturen durchschnittlich voneinander entfernt sind. Je kleiner der RMSD-Wert, desto ähnlicher sind sich die Strukturen. Die hier ermittelten kleinen RMSD-Werte spiegeln sich auch in der hohen Sequenzidentität von bis zu 75 % wider. Zwischen den hier gezeigten Strukturen und denen der PGAs aus Gram-negativen Bakterien zeigen sich bereits größere Differenzen. Der Gesamt-RMSD-Wert liegt bei der als Modell für die Strukturaufklärung verwendeten PGA aus *P. rettgeri* und der FJAT-PGA bei 1,84 Å, sowie bei 1,87 Å für die Überlagerung der EcPGA und der FJAT-PGA (Mayer et al. 2019).

Trotz dieser Unterschiede zeigen alle drei hier untersuchten PGAs die typische PGA-Struktur, die auch PGAs aus Gram-negativen Bakterien aufweisen. Die PGA-Struktur ähnelt einem Dreieck mit ähnlichen Kantenlängen zwischen 60 und 80 Å, wie an der beispielhaft dargestellten Struktur der FJAT-PGA erkennbar ist (Abbildung 28).

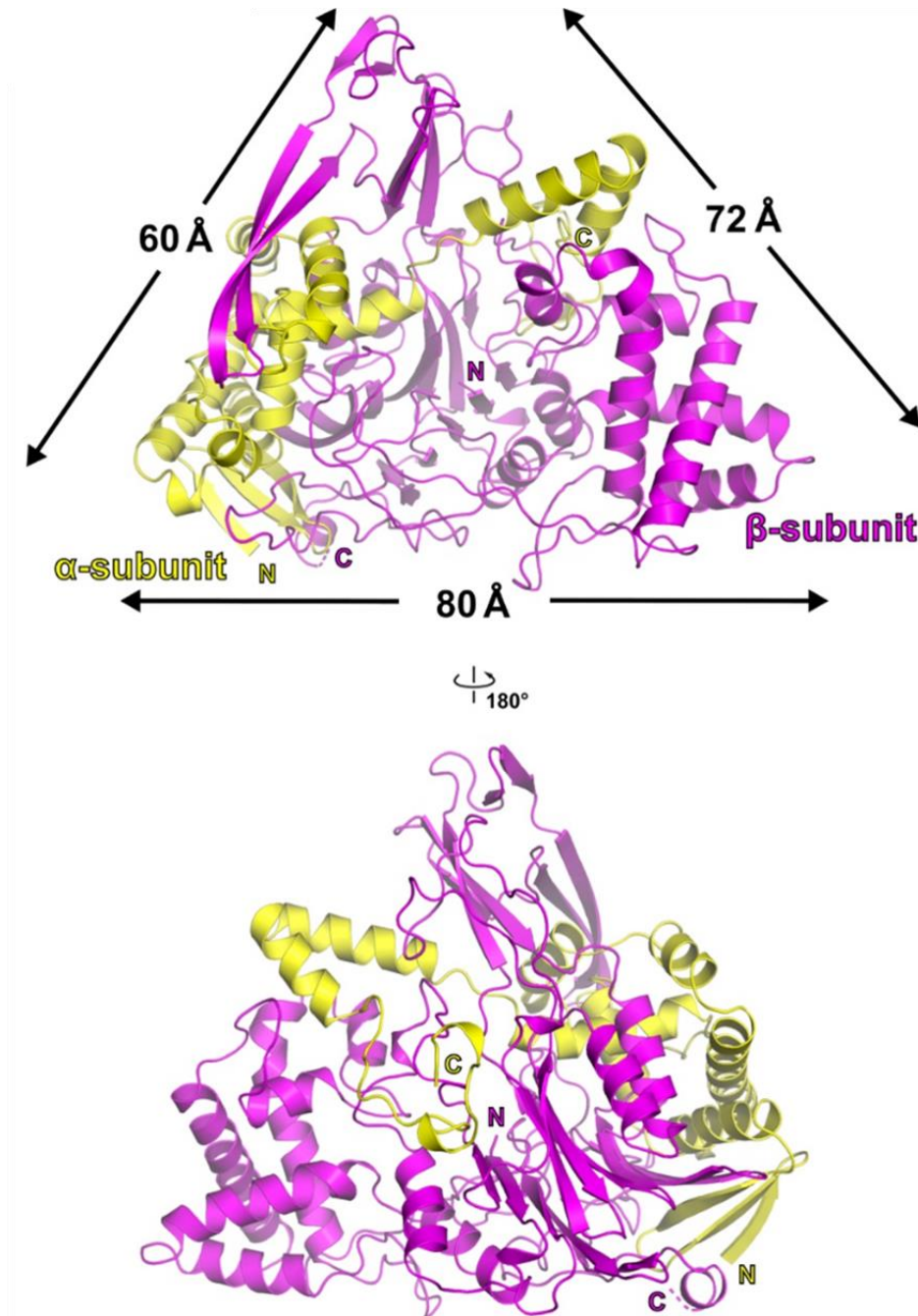


Abbildung 28: Vorder- und Rückansicht der FJAT-PGA. Die α -Untereinheit ist in gelb und die β -Untereinheit in magenta dargestellt. N und C markieren die Position der jeweiligen N- und C-Termini. Das aktive Zentrum befindet sich am N-Terminus der β -Untereinheit. Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jan Pippel und Prof. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig). Modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Alle drei PGAs bestehen aus einer kleineren α -Untereinheit mit einer Größe von etwa 25 kDa und einer größeren β -Untereinheit mit einer Größe von etwa 60 kDa, die durch nicht-kovalente Wechselwirkung miteinander verflochten sind.

Die Oberflächen sind bei den drei PGAs insgesamt deutlich unterschiedlich geladen (Abbildung 29), obwohl die Sequenzidentität zwischen 71 und 75 % liegt und auch die dreidimensionalen Strukturen sehr ähnlich sind. Bei der FJAT-PGA gibt es große Bereiche, die positiv geladen sind, während die BtPGA große Anteile mit negativer Ladung zeigt. Bei der BmPGA sind positiv und negativ geladene Bereiche etwa ähnlich verteilt. Diese unterschiedlichen Oberflächenladungen könnten z. B. die

unterschiedlichen Kristallmorphologien und Raumgruppen erklären oder Erklärungsansätze für unterschiedlichen Eigenschaften der PGAs, wie die Thermostabilität und die Löslichkeit, bieten.

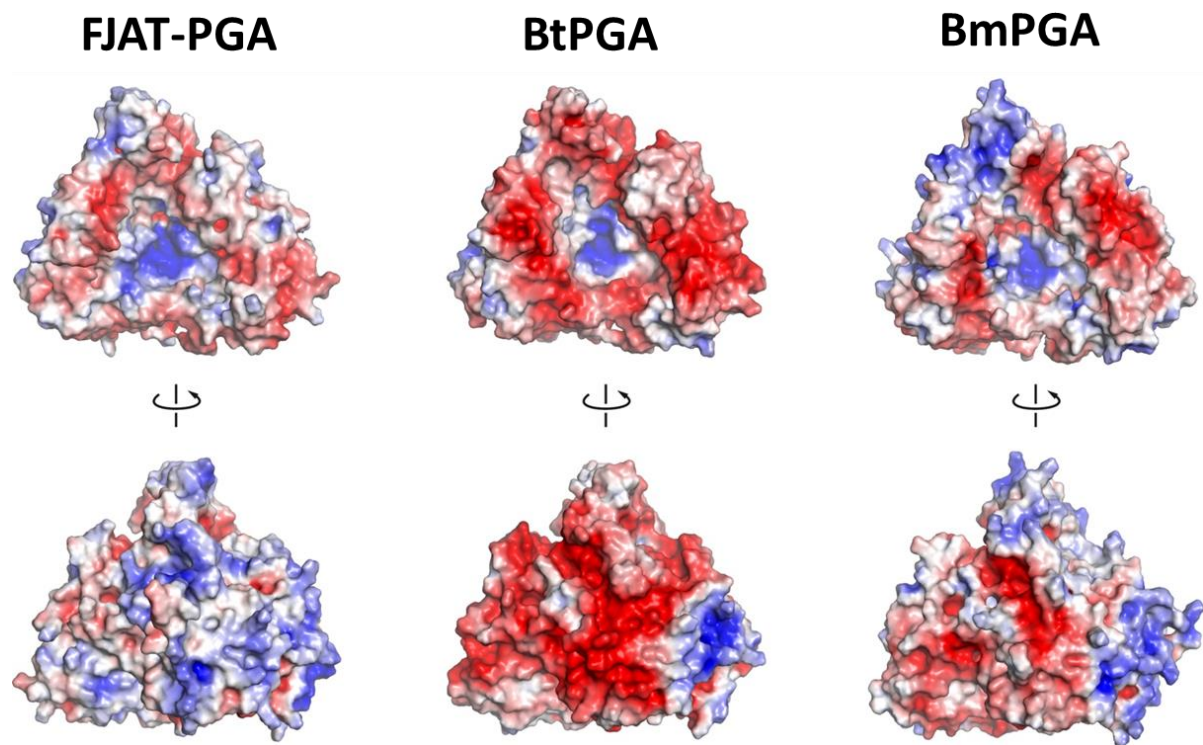


Abbildung 29: Vorder- und Rückansicht von FJAT-, Bt- und BmPGA mit ihrem elektrostatischen Oberflächenpotential. Gezeigt ist der Bereich $\pm 5 \text{ k}_B T/e$ mit positiver Ladung in blau und negativer in rot. Das elektrostatische Potential wurde mit APBS berechnet (Jurrus et al. 2018). Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jan Pippel und Prof. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig). Modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Das aktive Zentrum der PGAs sitzt in einer tiefen Bindetasche in der Mitte des Dreiecks und ist mehrheitlich positiv geladen (Abbildung 29). Die Ähnlichkeit zwischen PGAs aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zeigt sich auch im aktiven Zentrum beim Vergleich der an der Katalyse und Substratbindung beteiligten Aminosäurereste. Wie bei allen PGAs ist die katalytisch aktive Aminosäure das N-terminale Serin der β -Untereinheit, dessen nucleophiler Angriff zur Spaltung der Amidbindung der β -Lactam-Antibiotika führt. Auch die weiteren an der Katalyse und Substratbindung beteiligten Aminosäurereste sind in PGAs aus Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien konserviert (Abbildung 30). Die Aminosäuren α Y147, α F148 und β Y71 in der FJAT-, Bt- und BmPGA bzw. α R145, α F146 und β F71 in der EcPGA sind flexible Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind. Neben dem katalytischen Serin sind auch die Aminosäurereste β N245 bzw. β N241 für die enzymatische Aktivität essentiell, da diese den tetraedrischen Übergangszustand stabilisieren (McVey et al. 2001).

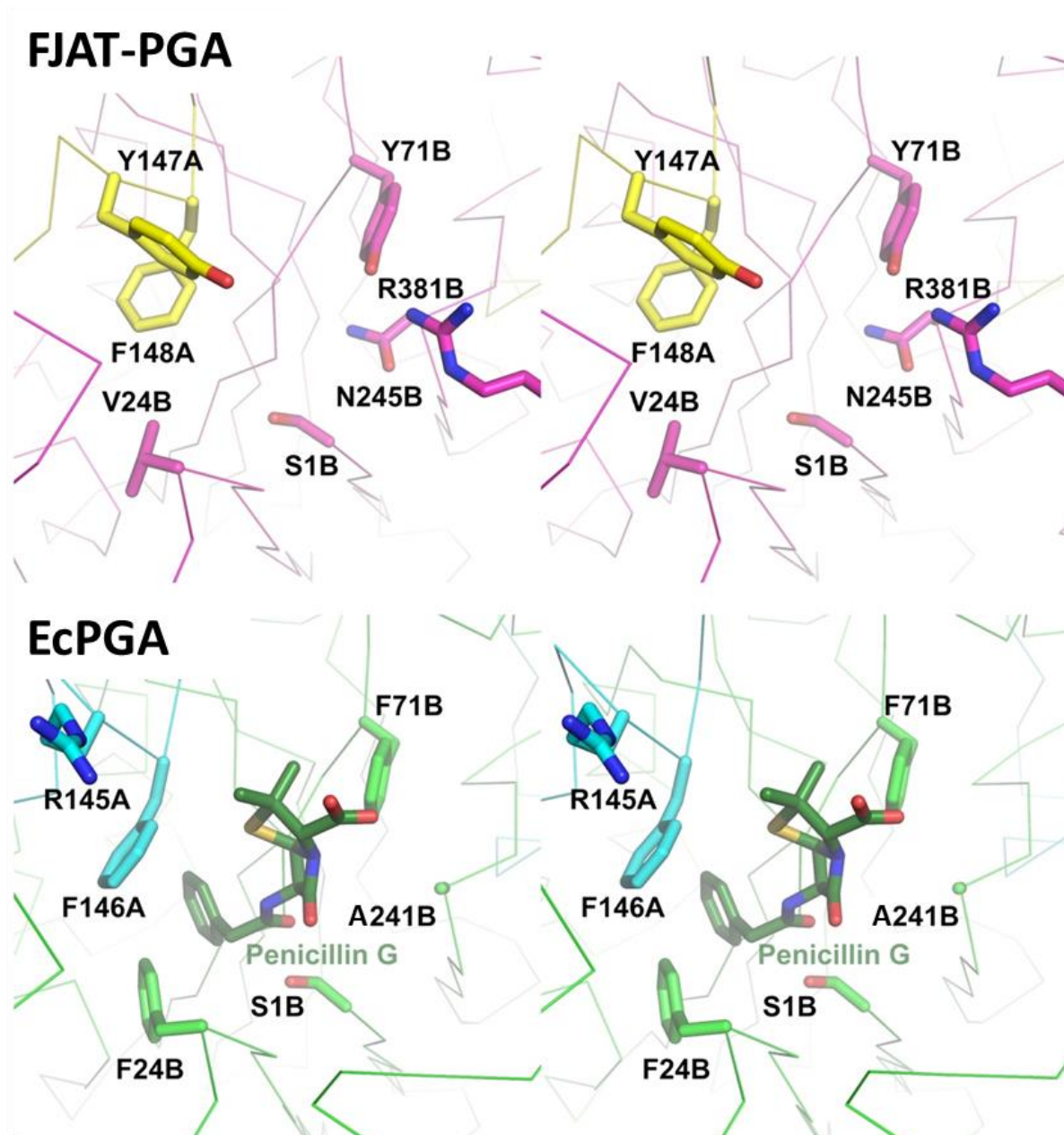


Abbildung 30: Vergleich der aktiven Zentren von FJAT-PGA (oben) und EcPGA (unten) als Cross-eyed Stereoplot. Aminosäurereste der α -Untereinheit sind in gelb oder türkis dargestellt, Aminosäurereste der β -Untereinheit in magenta oder grün. Die dargestellte EcPGA ist eine inaktive Variante (β N241A), die im Komplex mit Penicillin G kristallisiert wurde (PDB 1GM7) (McVey et al. 2001). Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode mit ihrer Position bezeichnet, A oder B steht für die Zugehörigkeit zur α - oder β -Untereinheit. Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jan Pippel und Prof. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig). Modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Obwohl die Strukturen von FJAT-, Bt- und BmPGA hinsichtlich Faltung und konservierten Aminosäuren große Ähnlichkeiten zu PGAs aus Gram-negativen Bakterien wie der EcPGA aufweisen, gibt es in der β -Untereinheit der EcPGA eine Insertion von 13 Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums, die in den hier untersuchten PGAs aus Gram-positiven Bakterien fehlt (Abbildung 31).

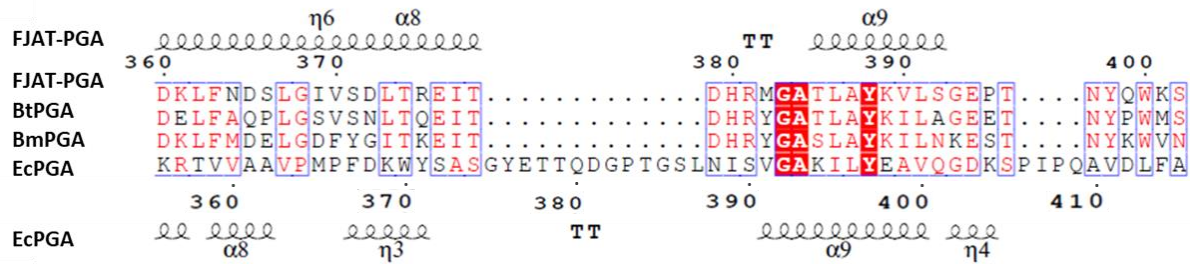


Abbildung 31: Sequenzalignment eines Ausschnitts der β -Untereinheit von FJAT-PGA, BtPGA, BmPGA und EcPGA. Sekundärstrukturelemente von FJAT- und EcPGA sind ober- bzw. unterhalb jeder Zeile dargestellt. α steht dabei für α -Helices, TT für β -Turns und η für 3_{10} -Helices. Die den Strukturelementen angeschlossene Zahl stellt die Anzahl des jeweiligen Elements in der β -Untereinheit dar. Das Alignment wurde mit PROMALS3D (Pei et al. 2014) und ESPript (Robert and Gouet 2014) erstellt, modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Während die entsprechende Region β 370 bis 400 in FJAT-, Bt- und BmPGA in zwei α -Helices gefaltet ist, die durch einen kleinen Loop verbunden sind (in der FJAT-PGA: α -Helix 8: β S371-T378, Loop: β D379-A384, α -Helix 9: β T385-S392), liegt in PGAs aus Gram-negativen Bakterien ein viel längerer Loop vor (in der EcPGA: Helix η_3 : β F367-Y371, Loop: β S372-S390, α -Helix 9: β V391-V400), welcher in die aktive Tasche hineinragt und deren Ausdehnung verkleinert (Abbildung 31 und 32).

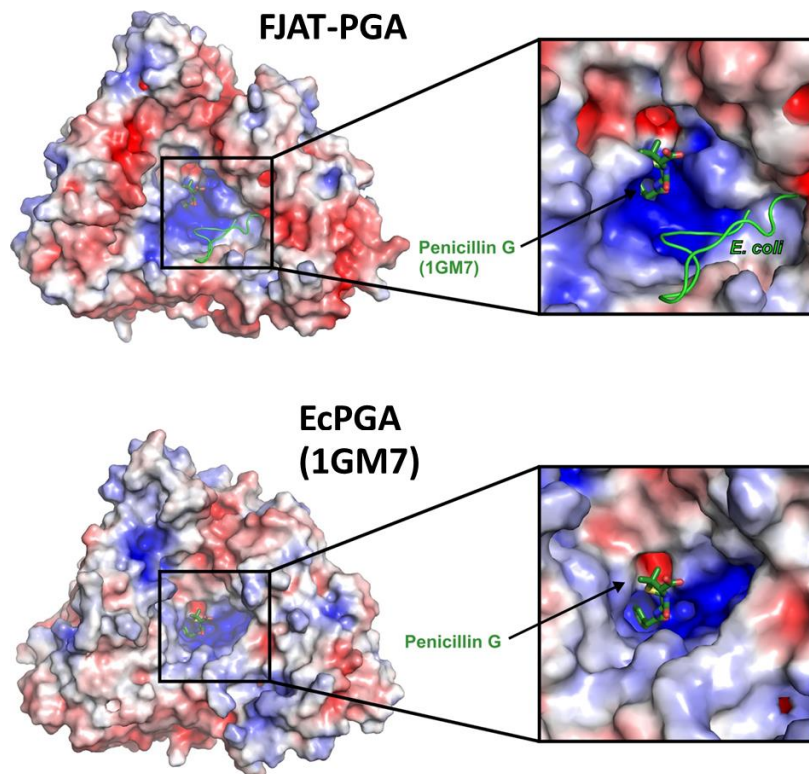


Abbildung 32: Vergleich der molekularen Oberflächen von FJAT-PGA (oben) und EcPGA (unten). Die Oberflächen sind gemäß ihrem elektrostatischen Potential im Bereich ± 5 kT/e gefärbt, positive Ladung in blau und negative in rot. In der Vergrößerung sind die aktiven Zentren gezeigt. Bei der dargestellten EcPGA handelt es sich um eine inaktive Variante (β N241A), die im Komplex mit Penicillin G (grün) kristallisiert wurde (PDB 1GM7) (McVey et al. 2001). In die FJAT-PGA-Struktur wurde Penicillin G (grün) modelliert. Der grüne Loop in der FJAT-PGA-Struktur stellt zusätzliche Aminosäuren in PGAs aus Gram-negativen Bakterien dar, welche die aktive Tasche dieser verkleinern (Mayer et al. 2019). Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jan Pippel und Prof. Wulf Blankenfeldt durchgeführt (HZI Braunschweig).

Dadurch ist es vorstellbar, dass die hier untersuchten PGAs aus Gram-positiven Bakterien ein anderes Substratspektrum als die bereits charakterisierten PGAs aus Gram-negativen Bakterien aufweisen.

Diese Hypothese könnte dadurch unterstützt werden, dass die Modellierung von Penicillin G aus der Struktur der EcPGA mit dem PDB-Code 1GM7 (McVey et al. 2001) in die FJAT-PGA einige sterische Hinderungen durch zu kurze Distanzen zwischen PGA und Penicillin G ergab (Abbildung 32). Allerdings ist für EcPGA bekannt, dass es während der Substratbindung zu Konformationsänderungen in der Bindetasche kommt (Alkema et al. 2002b). Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass die FJAT-, Bt- und BmPGA ihr natürliches Substrat Penicillin G hydrolysieren können. Wahrscheinlich ist, dass es bei den hier untersuchten PGAs ebenfalls zu einer Konformationsänderung während der Substratbindung kommt. Dies soll durch Kristallisation mit Substrat oder Produkt weiter untersucht werden.

Neben dem fehlenden Loop gibt es in der Struktur der PGAs aus *Bacillus* spp. weiterhin die Besonderheit, dass der Rest β R381, zu dem es in der EcPGA keinen homologen Rest gibt, relativ weit in Richtung Substratbindetasche ragt und mit negativ geladenen Bereichen eines Substratmoleküls interagieren könnte (Mayer et al. 2019). Dies könnte dazu führen, dass Substrate in leicht veränderter Orientierung im Vergleich zur EcPGA binden müssten. Deshalb wäre die Analyse des Substratspektrums der PGAs aus *Bacillus* spp. im Vergleich zur EcPGA und eine Untersuchung der entsprechenden Substratbindung interessant.

4.4 Untersuchung des Substratspektrums der PGAs aus *Bacillus* species

Penicillin G Acylasen sind in vielen Arten von Pilzen und Bakterien verbreitet. Obwohl alle mit der Spaltung oder Bildung einer Amidbindung die gleiche Reaktion katalysieren, zeigen PGAs oft unterschiedliche Substratspezifitäten (Li et al. 2020). Beispielsweise können je nach Anzahl aromatischer oder aliphatischer Aminosäurereste im aktiven Zentrum entsprechend β -Lactame mit aromatischen oder aliphatischen Seitenketten bevorzugt werden (Torres-Guzmán et al. 2002; Torres et al. 2013). Die EcPGA und auch die hier beschriebenen PGAs aus *Bacillus* spp. zeigen eine ähnliche Anordnung von aromatischen Aminosäuren im aktiven Zentrum bei weniger aliphatischen (Abbildung 30), was für eine Präferenz von aromatischen β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin G spricht. Allerdings besitzt die EcPGA, wie bereits diskutiert, im Gegensatz zu den PGAs aus *Bacillus* spp. einen zusätzlichen Loop, der in die aktive Tasche ragt und diese so verkleinert (Abbildung 32). Deshalb sollte das Substratspektrum von FJAT-, Bt- und BmPGA im Vergleich zur EcPGA untersucht werden. Dazu wurden verschiedene β -Lactam-Antibiotika aus den Stoffklassen der Penicilline oder Cephalosporine mit unterschiedlichen Seitenketten an Acylteil oder β -Lactam-Nucleus ausgewählt (Abbildung 33). Deren Hydrolyse durch die FJAT-, Bt- und BmPGA sowie einer EcPGA von Sigma Aldrich wurde analysiert. Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurde die Hydrolyse-Aktivität von PGAs durch Hydrolyse des Modellsubstrats NIPAB in einem colorimetrischen Assays bestimmt. Für die Hydrolyse aller anderen Substrate wurde nun zunächst ein HPLC-Verfahren zur Analyse etabliert und dieses für alle Substrate und Produkte einzeln optimiert (Kapitel 3.8.8).

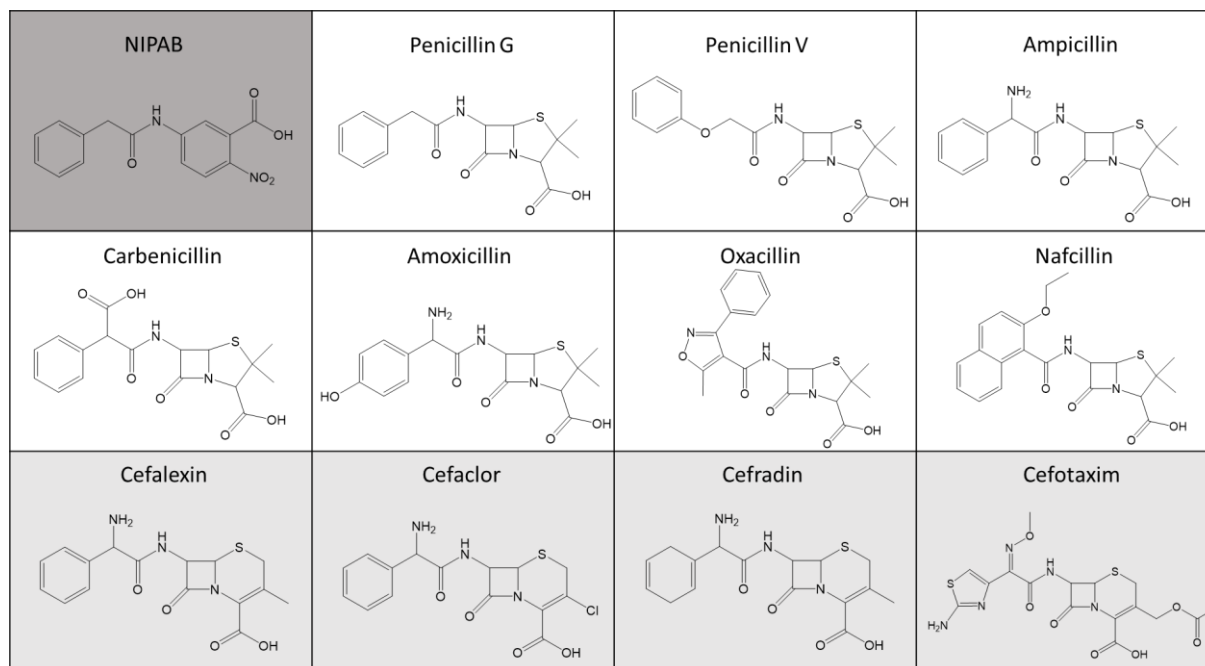


Abbildung 33: Strukturformeln des Modells substrats 6-Nitro-3-(phenylacetamido)benzoesäure (NIPAB) (dunkelgrau) und in der Hydrolyse-Reaktion getesteten Penicillin- (weiß) und Cephalosporin-Derivate (hellgrau). NIPAB wurde als Penicillin G-Substratanalogon einem kinetischen Assay eingesetzt, um die Hydrolyse-Aktivität von PGAs zu bestimmen. Die Hydrolyse der Penicillin- und Cephalosporin-Derivate durch PGAs wurde durch Aktivitätstests bei 37 °C und anschließende HPLC-Analyse untersucht.

Zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität wurden zunächst Aktivitätstests mit allen genannten Substraten in 50 mM NaPh-Puffer (pH 7,5) mit verschiedenen Enzymkonzentrationen bei 37 °C durchgeführt. Innerhalb von 60 Minuten wurde die Abnahme der Substratkonzentration untersucht. Dazu wurde jeweils eine Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von Methanol gestoppt. Zur chromatographischen Trennung wurde eine Chromolith® HighResolution RP-18e HPLC-Säule verwendet. Die gemessenen Peakflächen wurden mithilfe von Standardgeraden für das jeweilige Substrat in Konzentrationen umgerechnet.

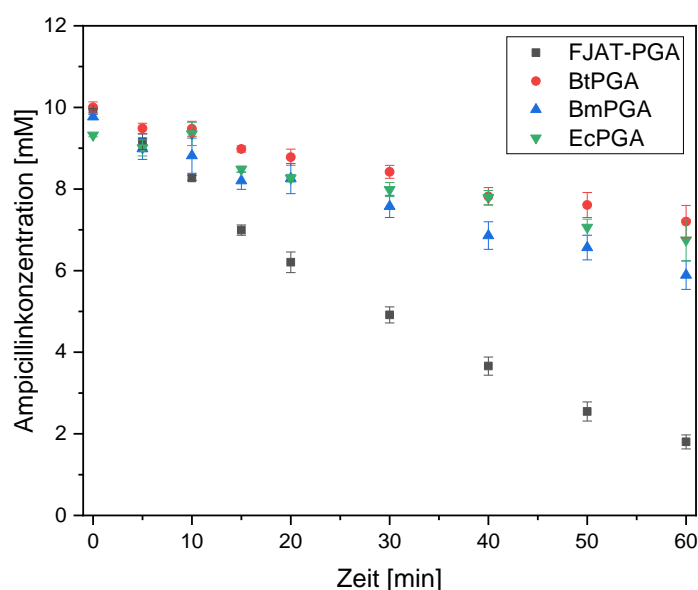


Abbildung 34: Hydrolyse von Ampicillin durch FJAT-, Bt-, Bm- und EcPGA. Die Reaktion wurde in 50 mM NaPh-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C als Triplikat durchgeführt und zu den gezeigten Zeitpunkten jeweils durch Zugabe von Methanol gestoppt. Die Ampicillinkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt.

Durch Auftragung der Konzentration gegen die Zeit konnte die zeitabhängige Abnahme der Substratkonzentration beobachtet werden. Beispielweise zeigte sich bei der Hydrolyse von Ampicillin die schnellste und größte Abnahme der Substratkonzentration bei Katalyse mit der FJAT-PGA (Abbildung 34). Die Hydrolyse-Aktivität in $\text{U/mg}_{\text{Enzym}}$ wurde über die Steigung der Substratabnahme berechnet (Tabelle 28). Dabei ist zu beachten, dass alle Tests bei standardisierten Bedingungen bei einem pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt wurden. Nach Optimierung der Bedingungen für die jeweilige PGA und jedes Substrates könnten sich die Ergebnisse noch verändern. Die größten Hydrolyse-Aktivitäten konnten mit allen getesteten PGAs für das natürliche Substrat Penicillin G erzielt werden. Dabei wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten mit der FJAT- (177 $\text{U/mg}_{\text{Enzym}}$) und BtPGA (119 $\text{U/mg}_{\text{Enzym}}$) erreicht. Diese Aktivitäten waren 3,6- (BtPGA) bis 5,4-mal (FJAT-PGA) höher als die der EcPGA (33 U/mg). Auch beim colorimetrischen NIPAB-Assay zeigten die PGAs aus *Bacillus* spp. eine 3,5- (BtPGA) bis 4,5-fach (FJAT-PGA) höhere Aktivität verglichen mit der EcPGA (Tabelle 28). Dies bestätigte erneut, dass sich der NIPAB-Assay als alternative Methode zur schnellen Bestimmung der Aktivität eignet. Wie in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, haben die FJAT-, Bt- und BmPGA deutlich höhere Temperaturoptima als die EcPGA. Wahrscheinlich könnte die Hydrolyse-Aktivität dieser PGAs zukünftig durch Verwendung höherer Temperaturen noch weiter gesteigert werden, sodass sie eine gute Alternative für die industrielle Hydrolyse von β -Lactam-Antibiotika darstellen würden.

Tabelle 28: Spezifische Hydrolyse-Aktivitäten von FJAT-, Bt-, Bm- und EcPGA bei der Hydrolyse ausgewählter Substrate, n.d. = nicht detektierbar.

Substrat	Spezifische Aktivität [U/mg]			
	FJAT-PGA	BtPGA	BmPGA	EcPGA
NIPAB	$13,69 \pm 0,84$	$10,64 \pm 0,27$	$11,96 \pm 0,95$	$3,04 \pm 0,30$
Penicillin G	$176,52 \pm 6,45$	$119,01 \pm 2,95$	$87,75 \pm 2,36$	$32,72 \pm 2,24$
Penicillin V	$3,95 \pm 0,37$	$1,27 \pm 0,11$	$1,71 \pm 0,26$	$1,92 \pm 0,24$
Ampicillin	$32,41 \pm 2,49$	$6,21 \pm 0,95$	$17,77 \pm 1,38$	$6,40 \pm 0,25$
Carbenicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amoxicillin	n.d.	n.d.	n.d.	$4,92 \pm 0,37$
Cefalexin	$33,09 \pm 0,26$	$9,03 \pm 0,72$	$25,66 \pm 0,77$	$7,60 \pm 1,07$
Cefaclor	$35,84 \pm 0,73$	$11,89 \pm 1,05$	$33,92 \pm 1,87$	$12,07 \pm 1,90$
Cefotaxim	$0,53 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,002$	$0,87 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,03$
Cefradin	$1,65 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,12$	$2,76 \pm 0,12$	$2,78 \pm 0,22$
Nafcillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Oxacillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vergleichsweise hohe Aktivitäten konnten weiterhin für die Hydrolyse von Ampicillin (bis 32 U/mg), Cefalexin (bis 33 U/mg) und Cefaclor (bis 36 U/mg) beobachtet werden, wobei auch hier die höchsten Aktivitäten mit der FJAT-PGA erreicht wurden, gefolgt von der BmPGA (Tabelle 28). Dies zeigte zum einen, dass PGAs ein eher breites Substratspektrum haben und neben Penicillin G auch die strukturell ähnlichen Cephalosporine umsetzen können, obwohl es auch spezifische Cephalosporin Acylasen gibt. Zum anderen zeigte sich, dass die verglichen mit Penicillin G zusätzliche Aminogruppe, die sich bei Ampicillin, Cefalexin und Cefaclor jeweils am C_β -Atom befindet, einen negativen Einfluss auf die

katalytische Aktivität hatte. Die Aktivitäten waren bei diesen Substraten mindestens um den Faktor 3 geringer als beim natürlichen Substrat Penicillin G. Allerdings schienen sie im Gegensatz zu anders modifizierten Substraten immer noch gut in die aktive Tasche der PGAs zu passen, sodass die Hydrolyse stattfinden konnte.

Interessanterweise konnte nur die EcPGA unter den gewählten Bedingungen Amoxicillin spalten, während mit den PGAs aus *Bacillus* spp. keine Aktivität nachweisbar war. Möglicherweise führte die Hydroxylgruppe, die sich an der para-Position des Benzolrings befindet, zu einer sterischen Hinderung in FJAT-, Bt- und BmPGA. Dies könnte durch eine Strukturaufklärung mit Substrat weiter untersucht werden.

Die Substrate Carbenicillin, Nafcillin und Oxacillin konnten unter den getesteten Bedingungen von keiner der untersuchten PGAs hydrolysiert werden. Wahrscheinlich kam es durch die großen Seitenketten zu sterischen Hinderungen und die Substrate passten somit nicht in die aktive Tasche der Enzyme. Bei Nafcillin und Oxacillin wurde dies aufgrund der sehr großen Seitenketten bereits vermutet (Abbildung 35). Unerwartet war allerdings, dass Carbenicillin von den PGAs nicht hydrolysiert werden konnte. Bei Carbenicillin befindet sich eine Carboxylgruppe am C β -Atom, an dem bei Ampicillin die Aminogruppe liegt, welche keinen vollständigen Aktivitätsverlust, sondern nur eine Herabsetzung der Aktivität bewirkte. Möglicherweise führte die Carboxylgruppe des Carbenicillins wegen ihrer Größe oder Ladung zu einer noch größeren, sterischen Hinderung. Auch dies sollte durch Strukturaufklärung mit Substrat weiter untersucht werden.

Für ein besseres Verständnis der Substratumwandlung und -bindung sollte als nächstes die FJAT-PGA-Struktur mit Substrat gelöst werden. Da aber das Substrat Penicillin G vom aktiven Enzym umgesetzt werden würde und deshalb in der Struktur nicht mehr sichtbar wäre, ist hierfür eine inaktive FJAT-PGA-Variante nötig. Daher wurde zunächst das Produkt der Hydrolyse, Phenylelessigsäure, verwendet. Phenylelessigsäure wurde nach der Kristallisation der Wildtyp FJAT-PGA zu den Kristallen gegeben und diffundierte in die aktiven Zentren des Enzyms. Die Struktur wurde in Kooperation mit Dr. Peer Lukat (HZI Braunschweig) gelöst. Die Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung sind im Anhang dargestellt (Tabelle 37).

Bei der Lösung der Struktur der FJAT-PGA mit Phenylelessigsäure konnte eine Auflösung bis zu 1,9 Å erzielt werden. Die Raumgruppe und die Abmessungen der Einheitszelle entsprachen denen der FJAT-PGA. Auch die Aminosäurepositionen stimmten weitgehend überein. Durch eine Überlagerung der FJAT-PGA-Strukturen mit (grün) und ohne (cyanblau) Phenylelessigsäure zeigte sich allerdings, warum das in die FJAT-Struktur 6NVX modellierte Penicillin G aus der Struktur 1GM7 nicht richtig in die Bindetasche zu passen schien (Abbildung 32 und 35). Wenn sich ein Ligand wie die Phenylelessigsäure (PAA) im aktiven Zentrum der FJAT-PGA befindet, verschieben sich die Aminosäuren Y147 und F148 der α -Untereinheit leicht, sodass der Ligand besser in die Tasche passt, während die anderen drei Aminosäuren β S1, β V24 und β N245 in beiden Strukturen in der gleichen Position vorliegen (Abbildung 35). Gleiches wurde auch schon für die Reste α R145 und α F146 der EcPGA beobachtet, welche für die Substratbindung zuständig sind. Auch diese bewegen sich bei Substratbindung vom Substrat weg (Alkema et al. 2000). Die homologen Reste α Y147 und F148 der FJAT-PGA sind somit also auch für die Substratbindung verantwortlich.

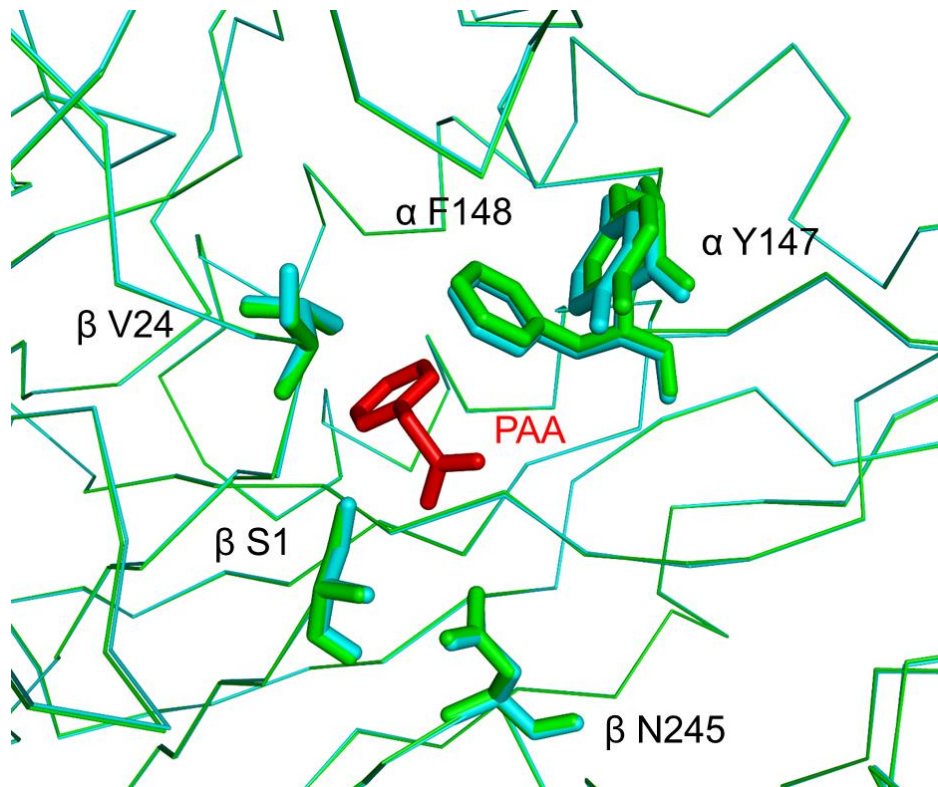


Abbildung 35: Alignment der FJAT-PGA Struktur 6NVX (Mayer et al. 2019) in cyanblau und der FJAT-PGA Struktur mit Phenyllessigsäure in grün. Die Phenyllessigsäure (PAA) ist in rot dargestellt. Die für Katalyse und Substratbindung wichtigen Reste α Y147, α F148, β S1, β V24 und β N245 sind hervorgehoben. Die Strukturaufklärung der FJAT-PGA mit PAA wurde von Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig).

Eine Überlagerung der FJAT-PGA-Struktur (grün) mit Phenyllessigsäure (rot) mit der EcPGA-Struktur (blau) mit Penicillin G (orange) aus Alkema et al. (2000) zeigte, dass die an der Katalyse und Substratbindung beteiligten Reste in FJAT- und EcPGA in ihren Positionen und Bewegungen konserviert sind, aber sich teilweise in der Art der Aminosäuren unterscheiden (Abbildung 36). An der Position β 24 befindet sich beispielsweise bei der FJAT-PGA ein Valin statt Phenylalanin (EcPGA). Weiterhin war zu beobachten, dass Phenyllessigsäure und Penicillin G in FJAT- bzw. EcPGA-Struktur nicht genau in der gleichen Position und Orientierung vorlagen und vermutlich deshalb die Reste α R145 und α F146 in der EcPGA stärker verschoben waren als die entsprechenden Aminosäurereste α Y147 und α F148 in der FJAT-PGA. Dies könnte zum einen daran liegen, dass mit Phenyllessigsäure nur der Acylrest des Penicillin Gs im Kristall vorlag, sodass sich die verschieden großen Reste unterschiedlich verhielten. Zum anderen könnten tatsächlich strukturelle Unterschiede in der Bindung vorliegen. Dies könnte auch erklären, warum die EcPGA Amoxicillin spalten konnte. Da das Substrat in der EcPGA in dieser Darstellung etwas weiter vorne sitzt, würde sich genau für die para-Hydroxylgruppe des Amoxicillins Platz ergeben (Abbildung 36).

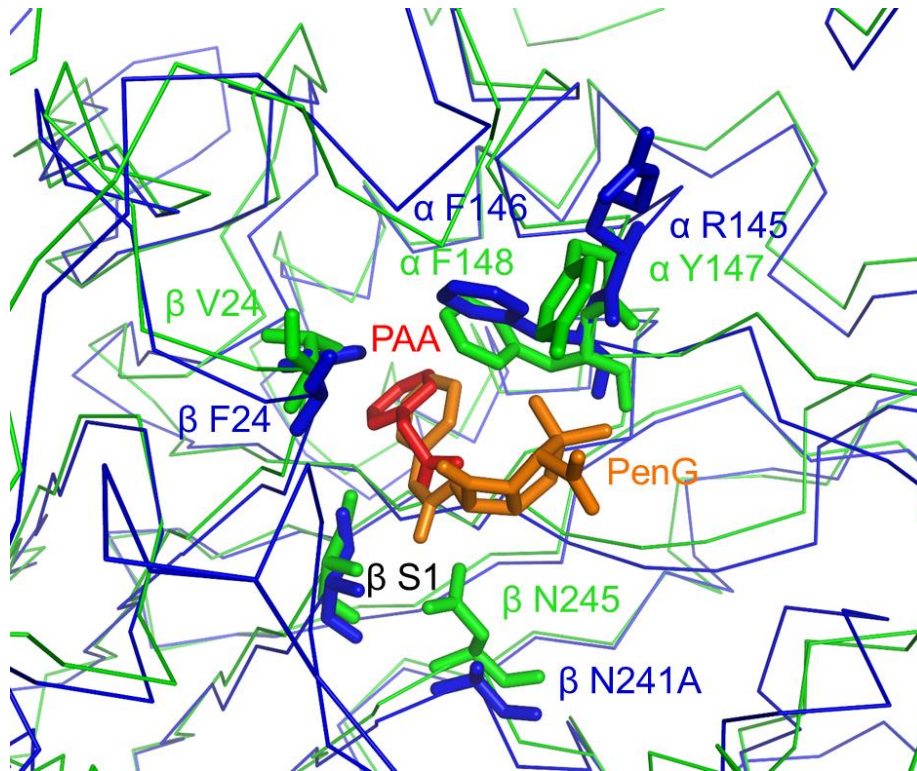


Abbildung 36: Alignment der FJAT-PGA Struktur (grün) mit Phenyllessigsäure (PAA, rot) und der EcPGA 1FXV (blau) mit Penicillin G (PenG, orange) (Alkema et al. 2000). Einige für Katalyse und Substratbindung wichtige Reste sind als Sticks hervorgehoben und gekennzeichnet. Die Strukturaufklärung der FJAT-PGA mit PAA wurde von Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig).

Um dies genauer zu untersuchen, wurde auch für die FJAT-PGA eine inaktive Mutante erzeugt. Dazu wurde der Aminosäureaustausch β N245A durch eine Punktmutation im korrespondierenden Gen wie bei der homologen EcPGA-Variante β N241A aus Alkema et al. (2000) durchgeführt (Abbildung 36). Der an dieser Position ursprüngliche Asparaginrest konnte das Oxyanion im tetraedrischen Übergangszustand stabilisieren und so die Reaktion ermöglichen. Die entstandene Variante β N245A war inaktiv, da Alanin als kleine, ungeladene Aminosäure das Oxyanion nicht stabilisierte, sodass die Reaktion nicht stattfinden konnte (Alkema et al. 2000).

Die inaktive FJAT-PGA-Variante β N245A wurde mit *B. megaterium* MS941 extrazellulär produziert, über Kationenaustausch- sowie Größenausschlusschromatographie gereinigt und gegen 10 mM HEPES (pH 7) dialysiert. Im NIPAB-Assay zeigte die Variante erwartungsgemäß keine Aktivität. In Kristallisationsbedingungen mit 100 mM HEPES (pH 7,5), 10 % PEG 8000 und 8 % Ethylenglycol bei Verwendung von 14 mg/mL der inaktiven FJAT-PGA-Variante in 10 mM HEPES (pH 7) wurden nach 6 Tagen erstmals vereinzelte Kristalle erhalten. Zu diesen Kristallen wurde Penicillin G gegeben, welches in die Substratbindetasche des Enzyms diffundierte. Die Aufnahme der Beugungsdaten und Lösung der Struktur wurde von Dr. Peer Lukat (HZI, Braunschweig) durchgeführt. Dabei konnte eine Auflösung von bis zu 1,5 Å erreicht werden. Allerdings war nur der Benzolring des Penicillin Gs deutlich sichtbar, der β -Lactam-Rest war nur als undeutliche Elektronendichte erkennbar. Wahrscheinlich war das Penicillin G entweder gespalten oder es waren nicht alle Positionen im Kristall mit Penicillin G besetzt. Außerdem war eine zusätzliche Elektronendichte am katalytisch aktiven Serin (β S1) erkennbar, die auf eine Modifikation oder alternative Konformationen des Serins hindeuten könnte. Möglicherweise wurde ein Teil des Penicillin G gespalten. Dies wäre beispielsweise möglich, wenn die

Variante doch eine geringe, im NIPAB-Assay nicht nachweisbare, Restaktivität aufwies. Die teilweise Spaltung von Penicillin könnte sowohl die undeutliche Elektronendichte am Penicillin G als auch die mögliche Modifikation oder alternative Konformation am Serin erklären. Während der Hydrolyse entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand durch nucleophilen Angriff des Serins (Abbildung 4). Diese Interaktion könnte durch die zusätzliche Elektronendichte sichtbar sein.

4.5 Untersuchung von quervernetzten Penicillin G Acylase-Kristallen (PGA-CLECs)

Die hier identifizierten PGAs aus *Bacillus* spp. zeigten bei der Hydrolyse verschiedener Substrate deutlich verbesserte Aktivitäten gegenüber der EcPGA, sodass diese für einen biokatalytischen Prozess zur Gewinnung von Vorläufermolekülen für semi-synthetische Antibiotika wie 6-APA oder 7-ADCA interessant werden könnten. Eine enzymatische Gewinnung dieser Substanzen wird aufgrund ihrer Effizienz und Selektivität unter milden Bedingungen meist einer rein chemischen Synthese vorgezogen. In biokatalytischen Prozessen kann jedoch die mangelnde Langzeitstabilität und schlechte Wiederverwendbarkeit von freien Enzymen von Nachteil sein. Um diesem entgegen zu wirken, können Enzyme immobilisiert werden (Sheldon and van Pelt 2013). Eine Möglichkeit zur Immobilisierung von Enzymen sind quervernetzte Enzym-Kristalle, sogenannte CLECs (cross-linked enzyme crystals). Zur Herstellung dieser Eigenimmobilisate werden die Enzyme zunächst kristallisiert und anschließend durch Vernetzungsreagenzien (Cross-Linker) wie Glutaraldehyd chemisch vernetzt (Bilal et al. 2019). Für einen möglichen Einsatz von CLECs als immobilisierter Biokatalysator sind sowohl die mechanische Stabilität als auch die Aktivität der CLECs ausschlaggebend. Um die Möglichkeit des Einsatzes von PGA-CLECs zu untersuchen, sollten zunächst mechanische Eigenschaften wie Härte und Elastizitätsmodul (E-Modul) mittels mikromechanischer Messungen durch Indentation mit einem Rasterkraftmikroskop von CLECs der PGAs aus *Bacillus* spp. bestimmt werden. Zur Bestimmung der Aktivität sollte wie bei freiem Enzym der NIPAB-Assay mit PGA-CLECs durchgeführt werden.

4.5.1 Kristalloptimierung und Herstellung von PGA-CLECs

Für die mikromechanischen Messungen war zunächst die Herstellung geeigneter CLECs notwendig. Zum einen mussten sich die CLECs dafür fest und unbeweglich auf einer ebenen Oberfläche befinden. Deshalb wurde die Dampfdiffusionskristallisation statt in einer Sitting Drop-Kristallisationsplatte als Sitting- oder Hanging Drop-Ansatz auf Deckgläschen in Petrischalen durchgeführt. Es wurden silikonisierte Deckgläschen (Jena Bioscience) verwendet, um durch die Funktionalisierung eine bessere Haftung der später entstehenden CLECs bei der Messung zu gewährleisten. Zum anderen sollten die Kristalle eine gleichbleibende Morphologie aufweisen, einzeln vorliegen und eine ebene Oberfläche besitzen. Durch Variationen von Konzentration und pH-Wert des Kristallisationspuffers, der Proteinkonzentration und des Verhältnisses von Protein und Puffer im Tropfen wurden die Kristalle dahingehend optimiert. Außerdem wurde das sogenannte Seeding eingesetzt, um die Kristalle weiter zu verbessern. Dabei werden bereits existierende Kristalle des Zielproteins zerkleinert und die entstandenen Kristallbruchstücke dem neuen Kristallisationsansatz bestehend aus Proteinlösung und Kristallisationspuffer zugesetzt. Dadurch kann die Reproduzierbarkeit der Kristallisation erhöht werden. Da die Kristallbruchstücke als Kristallisationskeime fungieren und so aus diesen Keimen

bereits Kristalle in der metastabilen Zone wachsen können, entfällt die Notwendigkeit die Nukleationszone mit starker Übersättigung zu erreichen (Abbildung 8) (D'Arcy et al. 2014).

Für die FJAT-PGA konnte durch Seeding zunächst eine schnellere Kristallisation und eine reproduzierbare Kristallform erreicht werden. Weiterhin konnten die Anzahl und Größe der Kristalle durch die Menge der eingesetzten Kristallbruchstücke beeinflusst werden. Bei Zugabe einer großen Anzahl von Kristallbruchstücken als Kristallisationskeime entstanden viele Kristalle, welche allerdings klein blieben, da die PGA-Konzentration im Tropfen durch die große Anzahl an wachsenden Kristallen schnell sank (Abbildung 37a). Mit geringerer Konzentration der Kristallbruchstücke nahm die Anzahl der Kristalle pro Tropfen ab und die Kristallgröße zu, da sich die PGA-Moleküle auf weniger Kristalle verteilten (Abbildung 37b und c).



Abbildung 37: Kristalle der FJAT-PGA. Bedingungen: 100 mM HEPES pH 7,5, 8 % (w/v) PEG 8000, PGA-Konzentration 10 mg/mL, 4:4:2 (Puffer:PGA:Seedsuspension). Verdünnung der Seedsuspension: a) unverdünnt, b) 1:10, c) 1:100.

Bei der Kristallisation der BtPGA zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei niedrigem pH-Wert kam es zu einer Präzipitatbildung (Abbildung 38a), die bei höheren pH-Werten nicht auftrat (38b und c). Bei den zunächst getesteten Bedingungen ohne Seeding entstanden meist Kristalle, die stark übereinanderlagen und verwachsen waren (38b). Da sich diese nicht für die mikromechanischen Messungen eigneten, wurden möglichst einzeln vorliegende BtPGA-Kristalle zerkleinert und für ein Kristallseeding eingesetzt. Nach Optimierung von pH-Wert und Seedverdünnung konnten so einzelne Kristalle erhalten werden (38c).



Abbildung 38: Kristalle der BtPGA. Bedingungen: 20 mM CaCl_2 + 100 mM Natriumacetat (pH 4,6) + 30 % MPD, PGA-Konzentration 6 mg/mL. Einstellung des pH-Wertes auf a) 4,96 b) 5,73 c) 5,57. Bei a und b sind Protein und Puffer 1:1 gemischt, bei c liegen Puffer, PGA und Seedsuspension im Verhältnis 4:4:2 vor.

Bei der Kristallisation der BmPGA wurden die besten Ergebnisse ebenfalls mithilfe von Seeding erhalten. Dabei stellte sich heraus, dass auch die Verdünnung der Seeds in einem anderen Puffer trotz Nutzung des gleichen Kristallisationspuffers zu deutlich unterschiedlichen Kristallmorphologien und -größen geführt hat. Als Kristallisationspuffer im Reservoir und im Tropfen wurde jeweils ein Puffer mit 200 mM Kaliumiodid und 20 % PEG 3350 verwendet. Zur Verdünnung der Seedsuspension wurde

in einigen Bedingungen 200 mM Magnesiumchlorid und in anderen 200 mM Kaliumiodid mit jeweils 20 % PEG 3350 verwendet. In Tropfen mit zusätzlichem MgCl_2 entstanden größere, quaderförmige Kristalle, während sich in Tropfen mit KI kleinere, quadratische Kristalle bildeten (Abbildung 39).

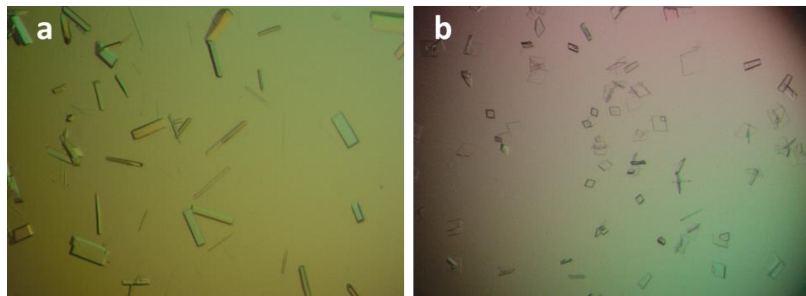


Abbildung 39: Kristalle der BmPGA. Bedingungen: 200 mM Kaliumiodid, 20 % PEG 3350, PGA-Konzentration 5 mg/mL, 4:4:2 (Puffer:PGA:Seedsuspension). a) die Seeds wurden in 200 mM MgCl_2 und 20 % PEG 3350 verdünnt, b) die Seeds wurden in 200 mM Kaliumiodid und 20 % PEG 3350 verdünnt.

Anschließend wurde die Mutterlauge von den Kristallen entfernt und diese mit dem jeweiligen Kristallisationspuffer gewaschen. Die erhaltenen Kristalle wurden dann für 24 h in einer 5%igen Glutaraldehyd-Lösung vernetzt, erneut gewaschen und für die Messung in ddH_2O gelagert.

4.5.2 Mechanische Messungen von PGA-CLECs durch AFM-basierte Nanoindentation

Die Kenntnis mechanischer Eigenschaften von CLECs ist für einen möglichen industriellen Einsatz notwendig, um dem Bruch der Partikel vorzubeugen (Kubiak et al. 2018) und so die Langzeitstabilität der CLECs zu gewährleisten. Deshalb sollten die mechanischen Eigenschaften mittels Nanoindentation mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM) untersucht werden. Die mikromechanischen Messungen der in dieser Arbeit hergestellten CLECs sowie die Bestimmung von deren Härte und E-Modul wurden im Rahmen einer Kooperation von der Projektpartnerin Marta Kubiak (iPAT, TU Braunschweig) durchgeführt.

Bei der AFM-Nanoindentation werden die CLECs mithilfe der Messnadel des AFMs, dem sogenannten Cantilever, eingedrückt. Dabei verbiegt sich der Cantilever entsprechend der Eindringtiefe der Messspitze in das Material. Diese Verbiegung kann mithilfe eines Laserstrahls auf einem Photodetektor gemessen und damit die Verformung des CLECs aufgezeichnet werden (Abbildung 40a) (Chow et al. 2012; Kubiak et al. 2018). Durch Auftragung der auf einen CLEC aufgetragenen Kraft gegen die Verformung des CLECs ergibt sich eine Kraft-Weg-Kurve (Abbildung 40b). Aus dieser können die Härte und das Elastizitätsmodul (E-Modul) als Maß für die Elastizität der CLECs nach Oliver und Pharr berechnet werden (Kubiak et al. 2018).

Für die Messungen mit dem AFM wurden aus entsprechenden Kristallen von FJAT-, Bt- und BmPGA (Kapitel 4.5.1) durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd CLECs hergestellt. Diese wurden dann mittels Nanoindentation mit einem Cantilever mit kugelförmiger Spitze mit einer Kraft von 250 nN beansprucht. Aus den dabei aufgenommenen Kraft-Weg-Kurven wurden Härte und E-Modul berechnet und jeweils als Summenverteilungen der Härte bzw. des E-Moduls der gemessenen CLECs dargestellt (Abbildung 41). Es wurden insgesamt 310 Messungen an BmPGA-CLECs, 284 an BtPGA-CLECs und 170 an FJAT-PGA-CLECs für die Darstellung der Summenverteilungen verwendet.

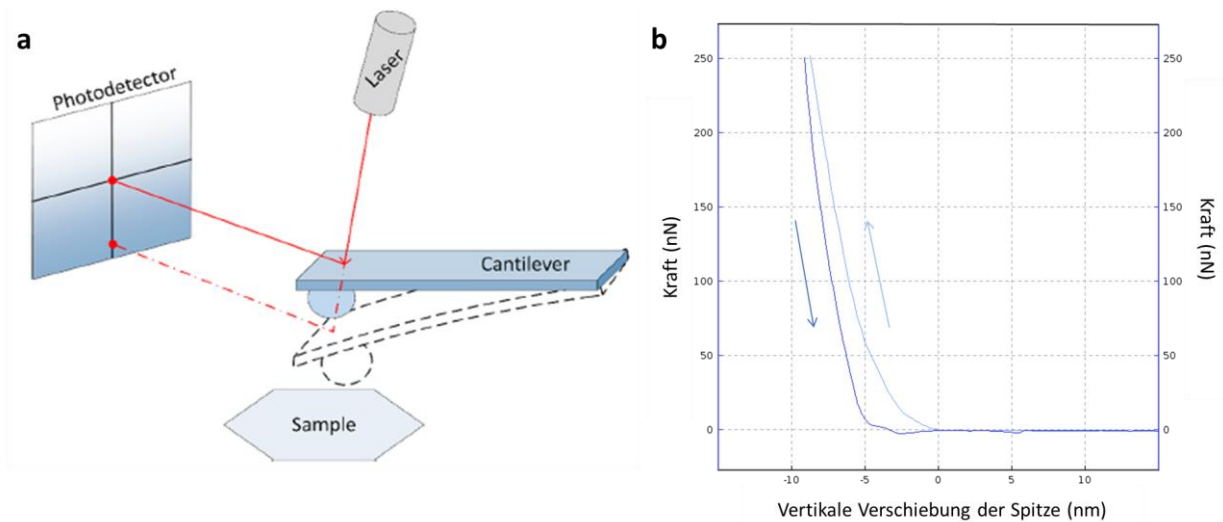


Abbildung 40: a) Schematische Darstellung des Messprinzips bei der Nanoindentation mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM). Durch einen Laserstrahl kann die Auslenkung des Cantilevers mit dem Photodetektor gemessen werden (Chow et al. 2012; Kubiak et al. 2018). b) Kraft-Weg-Kurve der AFM-Nanoindentation eines FJAT-PGA-CLECs. Der hellblaue Pfeil markiert die Kurve der einwirkenden Kraft und der dunkelblaue Pfeil die Kurve bei Rücknahme der Kraft. Die Messung wurde von Marta Kubiak (iPAT, TU Braunschweig) durchgeführt.

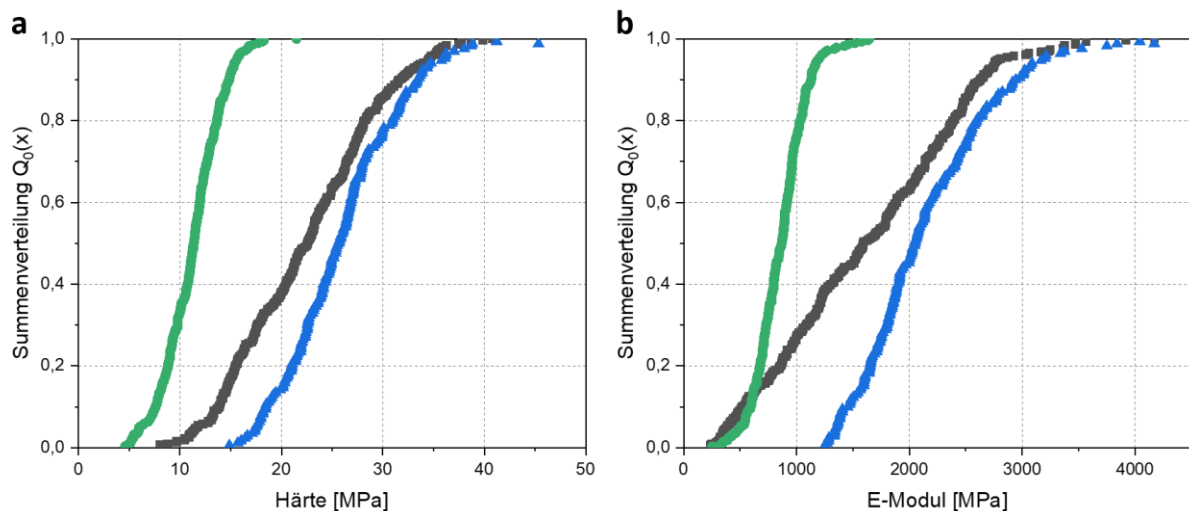


Abbildung 41: Summenverteilungen der Härte (a) und des Elastizitätsmoduls (E-Modul) (b) von BmPGA- (schwarz), BtPGA- (grün) und FJAT-PGA-CLECs (blau) nach AFM-Nanoindentation. Die Messung und Auswertung wurde von Marta Kubiak (iPAT, TU Braunschweig) durchgeführt.

Bei der Summenverteilung wird die Gesamtzahl der untersuchten PGA-CLECs als 1 gesetzt. Aus der Summenverteilung lässt sich dann ablesen, welcher Anteil der CLECs in einem bestimmten Wertebereich von Härte oder E-Modul liegt bzw. welcher Anteil der CLECs sich über oder unter einem bestimmten Wert von Härte und E-Modul befindet. Am Median ($Q_0(x) = 0,5$) liegen jeweils 50 % der Messwerte oberhalb und 50 % unterhalb dieses Wertes.

Anhand der Messergebnisse zeigte sich, dass die FJAT-PGA-CLECs mit einem Median von 25,7 MPa die größte Härte aufwiesen, gefolgt von den BmPGA-CLECs (22,6 MPa) und den BtPGA-CLECs (11,4 MPa). Die BmPGA-CLECs zeigten damit nur eine um 12 % geringere Härte als die FJAT-PGA-CLECs, während die BtPGA-CLECs eine um 66 % geringere Härte aufwiesen. Beim E-Modul ergab sich die gleiche Reihenfolge. Die FJAT-PGA-CLECs wiesen mit einem Median von 2050,5 MPa das größte E-Modul der

untersuchten PGAs auf, gefolgt von den BmPGA-CLECs (1591,9 MPa). Die BtPGA-CLECs besaßen mit 868,2 MPa das kleinste E-Modul (Abbildung 41). Das E-Modul kann als Widerstand beschrieben werden, den ein Material bei Verformung zeigt. Ein Material mit hohem E-Modul ist entsprechend steif, während ein Material mit geringem E-Modul sich verformt. Es handelte sich also bei den FJAT-PGA-CLECs um die steifsten, am wenigsten verformbaren PGA-CLECs, gefolgt von den BmPGA-CLECs und den BtPGA-CLECs.

Insgesamt zeigten sich bei den Verteilungen von Härte und E-Modul der Bt- und FJAT-PGA-CLECs kaum Überlappungen, da nahezu alle FJAT-PGA-CLECs härter und steifer waren als alle gemessenen BtPGA-CLECs. Weiterhin war auffällig, dass die Verteilungen von Härte und E-Modul bei den BtPGA-CLECs sehr schmal waren, während die Verteilungen bei den BmPGA-CLECs deutlich breiter waren. Beispielsweise zeigten einzelne BtPGA-CLECs Härten zwischen 4,6 und 21,5 MPa, während die Härte der BmPGA-CLECs in einem größeren Bereich zwischen 8,7 und 40,8 MPa lag (Abbildung 41). Die BtPGA-CLECs besaßen also untereinander insgesamt ähnliche Eigenschaften, während die BmPGA-CLECs eine größere Variabilität zeigten. Einige BmPGA-CLECs zeigten ähnliche Härte und E-Module wie die BtPGA-CLECs, während die härtesten und steifsten BmPGA-CLECs, die sich oberhalb von etwa 0,6 bei der $Q_0(x)$ -Verteilung befanden, eine ähnliche Härte und E-Module wie die FJAT-PGA-CLECs besaßen.

Wie bereits bei der Strukturaufklärung konnte eine Anisotropie auch bei den mechanischen Messungen der BmPGA-CLECs beobachtet werden. Bei einer Anisotropie liegen richtungsabhängig unterschiedliche Eigenschaften vor. Es wurden also je nach Seite, von der beansprucht wurde, unterschiedliche mechanische Festigkeiten der BmPGA-CLECs gemessen. Dies ist möglich, da sich die Orientierung, in der Moleküle angeordnet sind, je nach Richtung unterscheiden kann. Auch bei CLECs der Halohydrindehalogenase HheG war dies der Fall. Dort gab es zwei verschiedene Kristallflächen, die mit 11 MPa bzw. 14,5 MPa unterschiedliche Härten aufwiesen und sich auch morphologisch im Kristall zuordnen ließen. Dabei konnte eine bimodale Summenverteilung mit zwei Stufen für die beiden Flächen mit unterschiedlichen Härten beobachtet werden (Kubiak et al. 2019). Weil bei der BmPGA keine Stufen in der Summenverteilung erkennbar waren, ist die Anisotropie hier wahrscheinlich eher auf eine Vielzahl von weiteren Faktoren oder mehrere unterschiedliche Flächen zurückzuführen. Verunreinigungen an der Oberfläche oder Dislokationen im Kristall können die Messungen zusätzlich beeinflusst haben. Des Weiteren konnte bei HheG-CLECs festgestellt werden, dass Anisotropie vermehrt bei kurzer Quervernetzungszeit auftrat (Kubiak et al. 2019). Möglicherweise könnte die Anisotropie bei BmPGA-CLECs durch längere Quervernetzung verringert werden. Da die Kristalle unterschiedliche Größen aufwiesen, könnte der veränderte Diffusionswiderstand zu verschiedenen Quervernetzungsgraden und damit unterschiedlichen Härten einzelner CLECs geführt haben.

Die Ergebnisse der mikromechanischen Messungen zeigten, dass die mechanische Stabilität der CLECs nicht mit der thermischen Stabilität der PGAs korreliert werden kann. Zwar ist die FJAT-PGA die thermisch und mikromechanisch stabilste PGA, allerdings zeigten die BmPGA-CLECs nur eine leicht geringere mechanische Härte, obwohl die BmPGA mit einem Schmelzpunkt bei 56,8 °C deutlich weniger thermostabil als die FJAT-PGA (73,3 °C) war. Dahingegen zeigte die BtPGA eine mittlere Thermostabilität (64,5 °C), aber die geringste mechanische Stabilität der gemessenen PGA-CLECs. Für die thermische Stabilität sind hauptsächlich intramolekulare Wechselwirkungen wie beispielsweise

Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken innerhalb eines Moleküls verantwortlich, die die Entfaltung bei Hitze verzögern (Xu et al. 2020). Bei der mechanischen Stabilität hingegen spielen neben intramolekularen Wechselwirkungen auch die intermolekularen Wechselwirkungen vor allem an den Kristallkontakten und die Anordnung der Moleküle im Kristallgitter eine Rolle. Außerdem wird die mechanische Festigkeit stark von der Morphologie der Kristalle und von der Vernetzung mit Glutaraldehyd bestimmt (Kubiak et al. 2018).

Insgesamt zeigte sich bei der Bestimmung der mikromechanischen Eigenschaften, dass die FJAT- und BmPGA-CLECs deutlich stabiler waren als die BtPGA-CLECs. Um dies erklären zu können, wurde zunächst die Anordnung der Moleküle im Kristallgitter mithilfe von PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC) untersucht. Beim Vergleich der PGAs fiel auf, dass bei den BmPGA-Kristallen die einzelnen Moleküle sehr dicht zueinander angeordnet waren und nur kleine Wasserkanäle aufwiesen, während bei den BtPGA-Kristallen relativ große Freiräume zwischen den BtPGA-Molekülen erkennbar waren. Beim FJAT-PGA-Kristall war die Packung dichter als beim BtPGA-Kristall, aber die Wasserkanäle waren etwas größer als bei den BmPGA-Kristallen (Abbildung 42).

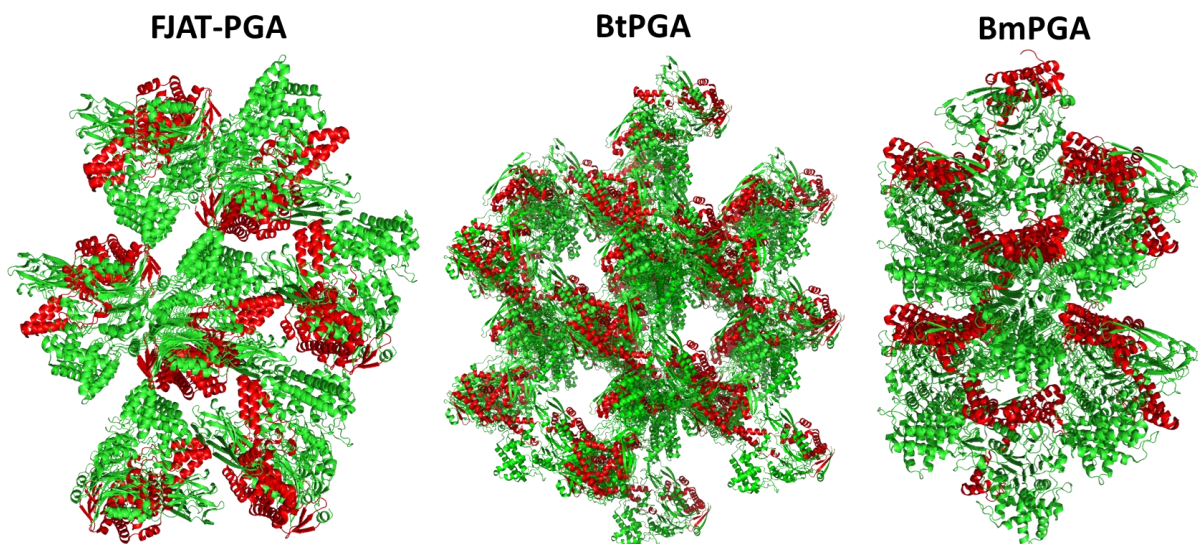


Abbildung 42: Anordnung symmetrieverwandter Moleküle im Kristallgitter von FJAT-, Bt- und BmPGA (6NVX, 6NVY, 6NVW aus Mayer et al. (2019)). Die α -Untereinheiten sind jeweils in rot dargestellt und die β -Untereinheiten in grün. Diese Abbildung wurde mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC) erstellt.

Diese Beobachtung spiegelte sich auch im Kristallwassergehalt und der Anzahl der benachbarten Moleküle wider. Die BmPGA-Kristalle wiesen mit 43,5 % den geringsten Wassergehalt der untersuchten PGAs auf. Ein Heterodimer war von 12 weiteren Heterodimeren umgeben, sodass sich für den BmPGA-Kristall die größte Packungsdichte ergab. Die BtPGA-Kristalle wiesen mit 64,8 % einen sehr hohen Kristallwassergehalt auf und die FJAT-PGA-Kristalle hatten mit 54,6 % einen mittleren Wassergehalt (Tabelle 29). Laut einer Auswertung aller PDB-Strukturen, die bis Februar 2007 veröffentlicht wurden, war der mittlere Kristallwassergehalt aller Strukturen 51 % (Chruszcz et al. 2008). Möglicherweise zeigten die BtPGA-CLECs aufgrund eines überdurchschnittlich hohen Kristallwassergehalts eine geringere Festigkeit als die anderen PGAs, während der unterdurchschnittliche Kristallwassergehalt der BmPGA zu keiner weiteren Steigerung der Stabilität führte.

Tabelle 29: Eigenschaften von FJAT-, Bt- und BmPGA-Kristallen.

	FJAT-PGA (6NVX)*	BtPGA (6NVY)*	BmPGA (6NVW)*
Gehalt an Kristallwasser im Kristallgitter [%]	54,55	64,76	43,46
Anzahl symmetrie-verwandter Enzyme in einer 12 Å-Umgebung	10	8	12
Anzahl Lysine	78	49	74

* In Klammern sind die PDB-Codes der Strukturen aus Mayer et al. (2019) angegeben.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erklärung der unterschiedlichen mechanischen Festigkeiten der PGA-CLECs war die Quervernetzung mit Glutaraldehyd. Deshalb wurde die Gesamtanzahl der Aminosäure Lysin pro Heterodimer analysiert, da diese hauptsächlich von Glutaraldehyd vernetzt wird (Yan et al. 2015). Das BtPGA-Heterodimer weist mit 49 Lysinen deutlich weniger Lysine auf als FJAT- (78) und BmPGA (74) (Tabelle 29). Auch die Härte der BtPGA-CLECs war deutlich geringer als die von FJAT- und BmPGA-CLECs. Durch die geringere Anzahl an Lysinen war die Quervernetzung der BtPGA-CLECs wahrscheinlich weniger stark und die CLECs dadurch möglicherweise weniger stabil als FJAT- und BmPGA-CLECs.

Ein Vergleich der mikromechanischen Eigenschaften der PGA-CLECs aus *Bacillus* spp. mit bereits veröffentlichten mikromechanischen Eigenschaften von CLECs der Halohydrindehalogenase HheG und Lysozym zeigte, dass die FJAT-PGA- und BmPGA-CLECs deutlich stabiler waren (Kubiak et al. 2018; Kubiak et al. 2019). FJAT-PGA-CLECs mit 25,7 MPa und BmPGA-CLECs mit 22,6 MPa waren etwa doppelt so hart wie Lysozym- und HheG-CLECs. Härte und E-Modul von BtPGA-, HheG- und Lysozym-CLECs waren in etwa gleich. Der Kristallwassergehalt der HheG-Kristalle war mit 65 % ähnlich hoch wie der der BtPGA-Kristalle und könnte zusammen mit der geringen Anzahl an Lysinen von nur 0,17 kDa⁻¹ zu einer geringen mechanischen Stabilität geführt haben. Die Lysozym-Kristalle wiesen mit 40,5 % zwar den niedrigsten Wert für den Kristallwassergehalt auf, zeigten aber keine entsprechend hohe Festigkeit. Möglicherweise trug zusätzlich die geringere Anzahl an Lysinen (0,42 kDa⁻¹) verglichen mit denen von FJAT- und BmPGA (0,90 kDa⁻¹, 0,86 kDa⁻¹) dazu bei (Tabelle 30). Allerdings wurden die Lysozym-CLECs weniger lange quervernetzt (etwa 10 h). Wahrscheinlich wäre bei einer Quervernetzungszeit von 24 h eine größere Härte festgestellt worden. Bei HheG-Kristallen führte die Verlängerung der Quervernetzungszeit von 10 auf 24 h zu einer Verdreifachung der Härte (Kubiak et al. 2019).

Um die Einflüsse von Kristallwassergehalt und Anzahl der Lysine auf die mikromechanischen Eigenschaften weiter zu charakterisieren, müssten mehr Proteine entsprechend analysiert und mikromechanisch untersucht werden. Außerdem könnte die Anzahl der Lysine durch gerichtete Mutagenese vor allem nahe der Kristallkontakte verändert werden.

Weiterhin fiel auf, dass alle fünf Proteine in anderen Raumgruppen und Kristallsystemen kristallisierten. Beim Vergleich mit der Auswertung aller PDB-Strukturen, die bis Februar 2007 veröffentlicht wurden, zeigte sich, dass die durchschnittlichen Kristallwassergehalte von Kristallen verschiedener Kristallsysteme variieren. Die durchschnittlichen Kristallwassergehalte für orthorhombische und monokline Kristalle wie FJAT-PGA- bzw. BmPGA-Kristalle sind mit 49 bzw. 48 %

deutlich kleiner als die durchschnittlichen Kristallwassergehalte von hexagonalen (57 %), trigonalen (55 %) und tetragonalen Kristallen (56 %) (Chruszcz et al. 2008). Dies bestätigte sich auch bei den hier untersuchten Kristallen mit Ausnahme von Lysozym (Tabelle 30). Möglicherweise ist die Packungsdichte bei Lysozym wegen des geringen Molekulargewichts von 14,31 kDa besonders hoch und der Wassergehalt damit geringer. Durch Testen weiterer Kristalle könnte untersucht werden, ob eine signifikante Abhängigkeit zwischen Wassergehalt, Kristallform und mechanischen Eigenschaften besteht. Dazu könnte Lysozym als Modellprotein untersucht werden, da bereits Lysozym-Kristalle in verschiedenen Kristallsystemen erhalten wurden (Elgersma et al. 1992). Außerdem könnte versucht werden, Proteine beispielsweise durch genetische Methoden in der orthorhombischen oder monoklinen Form zu kristallisieren, mechanisch zu untersuchen und mit CLECs des gleichen Enzyms, aber anderer Kristallform zu vergleichen. Hierbei wäre auch die Kristallisation, Strukturaufklärung und mechanische Messung der bereits hergestellten Hybrid-PGAs interessant.

Tabelle 30: Mikromechanische und Kristall-Eigenschaften von FJAT-, Bt- und BmPGA-CLECs sowie HheG- und Lysozym-CLECs.

	FJAT-PGA-CLECs (6NVX) ^a	BtPGA-CLECs (6NVY) ^a	BmPGA-CLECs (6NVW) ^a	HheG-CLECs (5O3O) ^a	Lysozym-CLECs (3LYZ) ^a
Median der Härte [MPa]	25,7	11,4	22,6	Fläche 1: 11 ^b Fläche 2: 14,5 ^b	11,9 ^b
Median des E-Moduls [MPa]	2050,5	868,2	1591,9	Fläche 1: 500 ^b Fläche 2: nicht gezeigt ^b	1073 ^b
Gehalt an Lösemittel im Kristallgitter [%]	54,55	64,76	43,46	65,00	40,52
Anzahl Lysine / Molekulargewicht [kDa ⁻¹]	0,90	0,57	0,86	0,17	0,42
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	H3	P2 ₁	P3 ₁ 21	P4 ₃ 2 ₁ 2
Kristallsystem	ortho-rhombisch	hexagonal	monoklin	trigonal	tetragonal

^a In Klammern sind die PDB-Codes der Strukturen angegeben (Diamond 1974; Koopmeiners et al. 2017; Mayer et al. 2019).

^b Medianwerte von Härte und E-Modul der CLECs der Halohydrindehalogenase HheG stammen aus Kubiak et al. (2019) und Medianwerte von Härte und E-Modul der Lysozym-CLECs aus Kubiak et al. (2018).

4.5.3 Aktivität von PGA-CLECs

Für eine Anwendung der PGA-CLECs als immobilisierte Biokatalysatoren ist neben der Stabilität die Aktivität der CLECs von großer Wichtigkeit. Deshalb sollte die Aktivität der PGA-CLECs im NIPAB-Assay bestimmt werden. Dazu wurden Kristalle wie in 4.5.1 auf Deckgläschen hergestellt, mehrfach gewaschen, vernetzt und erneut mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die CLECs, die nun in einem 10 µL-Tropfen mit NaPh-Puffer (pH 7,5) vorlagen, mit 90 µL NIPAB-Lösung vom Deckglas in eine Mikrotiterplatte mit flachen Boden gespült und die Absorption bei 405 nm gemessen sowie die zunehmende Gelbfärbung beobachtet. Dabei zeigte sich beim Einsatz von FJAT-PGA- und BtPGA-CLECs

eine deutliche Gelbfärbung des Ansatzes. Diese ist auf die Freisetzung des Farbstoffes NABA infolge der erfolgreichen Hydrolyse von NIPAB zurückzuführen. Qualitativ konnte dadurch die Aktivität von FJAT- und BtPGA-CLECs festgestellt werden. Weiterhin war zu erkennen, dass es beim Einsatz der FJAT-PGA-CLECs schneller zu einer stärkeren Gelbfärbung als bei den BtPGA-CLECs kam und diese damit wahrscheinlich eine etwas höhere Aktivität aufwiesen. Während bei der Reaktion mit FJAT- und BtPGA-CLECs bereits nach einigen Sekunden eine Gelbfärbung zu beobachten war, dauerte dies bei den BmPGA-CLECs bis zu einer Stunde. Dies zeigte, dass die BmPGA-CLECs eine deutlich niedrigere Aktivität aufwiesen. Möglicherweise befinden sich bei der BmPGA Lysine in der Nähe des aktiven Zentrums, welche von Glutaraldehyd vernetzt wurden und die Aktivität so einschränkten. Weiterhin könnte der im letzten Kapitel (4.5.2) diskutierte geringe Anteil an Flüssigkeit im Kristallgitter und die dichte Packung zu stärkeren Diffusionslimitierungen als bei FJAT- und BtPGA-CLECs und damit verringerter Aktivität der BmPGA-CLECs geführt haben.

Insgesamt konnte also zunächst qualitativ gezeigt werden, dass FJAT- und BtPGA-CLECs aktiv sind. Allerdings konnte die Aktivität der CLECs noch nicht quantitativ im Vergleich zu der der nativen PGAs ermittelt werden, weil die Menge der eingesetzten CLECs nicht genau bestimmt werden konnte. Zur Bestimmung der CLEC-Menge wurde eine in Kooperation mit Jennifer Solarczek (Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, TU Braunschweig) entstandene, neue Methode getestet. Mithilfe einer 10 µL Chromatographie-Spritze (Hamilton Company, Reno, USA) wurde die Mutterlauge der erzeugten FJAT-PGA aufgenommen und das Volumen bestimmt. Durch Messung der Proteinkonzentration konnte mithilfe des Volumens die nicht-kristallisierte Proteinmenge in der Mutterlauge berechnet werden. Wird diese von der eingesetzten Proteinmenge subtrahiert, sollte sich daraus die Proteinmenge in den Kristallen ergeben. Die Kristalle wurden, wie oben beschrieben, gewaschen, vernetzt und im NIPAB-Assay eingesetzt, um die PGA-Aktivität zu bestimmen. Erneut zeigte sich, dass die FJAT-PGA-CLECs aktiv waren. Allerdings ergaben sich nur spezifische Aktivitäten zwischen 0,1 und 1,45 U/mg, was etwa 0,5 bis 10 % der spezifischen Aktivität der nativen FJAT-PGA entsprach. Eine geringere Aktivität der CLECs kommt zum einen durch die Diffusionslimitierung aufgrund der dichteren Packung im Kristall im Vergleich zu Enzymen in Lösung zustande. Zum anderen kam es während der Vernetzung und des Aktivitätstests über viele Schritte zu einem großen Verlust an Enzym, weshalb die spezifische Aktivität der FJAT-PGA-CLECs wahrscheinlich deutlich höher liegt als hier bestimmt. Um die Bestimmung verlässlicher zu machen, könnte eine Maßstabvergrößerung der Produktion und Kristallisation durchgeführt werden. Dies würde eine genauere Bestimmung der spezifischen Aktivität beispielsweise durch Bestimmung der CLEC-Trockenmasse ermöglichen. Eine Übertragbarkeit der Produktion im Schüttelkolben in einen 1 L-Reaktor konnte für die FJAT-PGA bereits gezeigt werden (Wichmann 2020). Weitere Optimierungen der Produktion und Maßstabsvergrößerung sollen zukünftig durchgeführt werden. Damit wäre es auch möglich, die mechanischen Eigenschaften von PGA-CLECs beispielsweise durch Beanspruchung in einer Scherzelle weiter zu untersuchen. Dies wurde in der Vergangenheit bereits mit CLECs durchgeführt (Lee et al. 2002). Die Messungen in der Scherzelle könnten möglicherweise weitere aussagekräftige Rückschlüsse auf die Belastbarkeit von CLECs in Produktionsprozessen zulassen, da mehrere CLECs und ihre Interaktionen gemessen werden können.

4.6 Konstruktion und Eigenschaften von Hybrid- und Single-chain PGAs

Neben der Immobilisierung der PGAs ist das Einfügen von Veränderungen auf genetischer Ebene eine Möglichkeit zur Optimierung der Stabilität und Aktivität von Enzymen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die einzelnen Untereinheiten der PGAs verschiedener Spezies auf Eigenschaften wie die Enzymaktivität oder Thermostabilität haben, wurden Hybrid-PGAs erzeugt, die jeweils aus Untereinheiten verschiedener PGAs bestehen. Zum anderen sollten sogenannte Single-chain PGAs, bei denen die Untereinheiten durch einen artifiziellen Linker kovalent miteinander verbunden sind, erstellt werden, um hier insbesondere die Thermostabilität zu untersuchen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Konstruktion von Einzelketten- oder Hybridproteinen eine wirkungsvolle Methode zur Erzeugung von Proteinen mit verbesserten Eigenschaften und neuartigen Funktionen sein kann (Robinson and Sauer 1998).

4.6.1 Erstellung und Charakterisierung von Hybrid-PGAs

Zunächst wurden *in silico* Modelle von möglichen Hybrid-PGAs erstellt. Diese zeigten keine negativen Interaktionen von Aminosäureresten durch das Vertauschen der Untereinheiten (Mayer et al. 2019). Alle zur Konstruktion ausgewählten Hybrid-PGAs enthielten entweder die α - oder β -Untereinheit der FJAT-PGA, weil sich diese in den vorangegangenen Versuchen als die aktivste und stabilste der hier analysierten PGAs herausgestellt hat. Die FJAT-PGA-Untereinheiten wurden dann mit der jeweils anderen Untereinheit von Bt- bzw. BmPGA kombiniert. Das Signalpeptid stammte immer aus der gleichen PGA wie die α -Untereinheit, um eine effektive Abspaltung sicherzustellen. Die Linker stammten aus FJAT- oder BmPGA. Da diese aber während der Prozessierung autokatalytisch abgespalten werden, sind sie nicht mehr Teil des aktiven Enzyms (Abbildung 43).

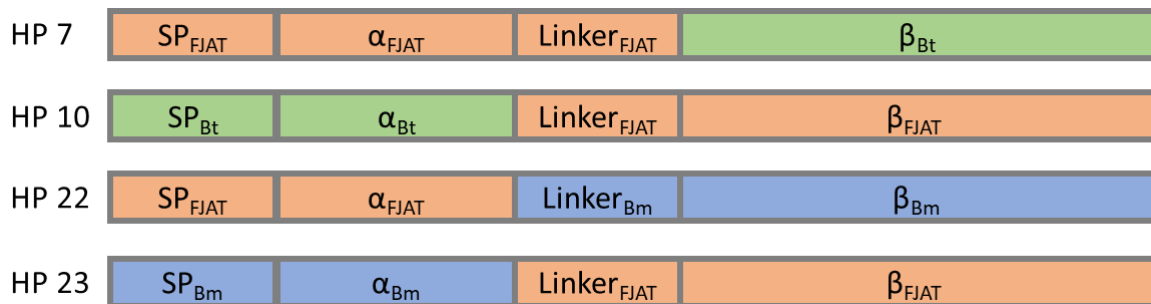


Abbildung 43: Anteilige Zusammensetzung der Präpro-Hybrid-PGA von HP 7, 10, 22 und 23 aus Signalpeptid (SP), α -Untereinheit (α), Linker und β -Untereinheit (β) aus FJAT-PGA (orange), BtPGA (grün) und BmPGA (blau).

Zur *in vivo* Produktion der Hybrid-PGAs wurde die jeweilige korrespondierende Sequenz der Untereinheiten einzeln durch PCR amplifiziert, durch passende Überhänge zu den *hybridpga*-Genen zusammengesetzt und in den *B. megaterium* Shuttlevektor p3STOP1623hp integriert (Stammen et al. 2010). Nach Amplifikation der konstruierten Plasmide in *E. coli* DH10B wurde die Sequenz der *hybridpga*-Gene mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Nach Transformation von *B. megaterium* MS941 mit den entsprechenden Plasmiden wurden die Hybrid-PGAs HP 7 (α_{FJAT} – β_{Bt}), HP 10 (α_{Bt} – β_{FJAT}), HP 22 (α_{FJAT} – β_{Bm}) und HP 23 (α_{Bm} – β_{FJAT}) produziert, sekretiert und gereinigt. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte die erfolgreiche Reinigung aller Hybrid-PGA-Varianten, sodass eine entsprechende Produktion, Sekretion und Prozessierung vorausgegangen sein muss. Alle Hybrid-PGAs sind an ihren

charakteristischen Banden für α - und β -Untereinheit bei relativen Molmassen von etwa 25.000 bis 30.000 und 60.000 erkennbar (Abbildung 44).

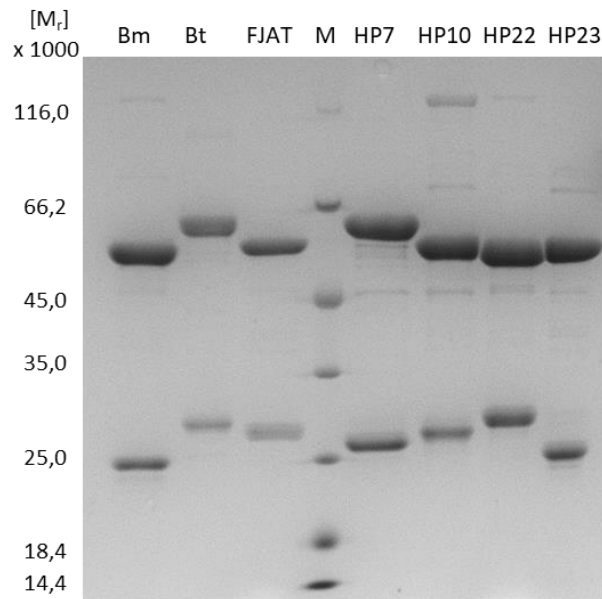


Abbildung 44: SDS-PAGE der Wildtyp- und Hybrid-PGAs. Zur Produktion und Sekretion wurde *B. megaterium* MS941 mit den entsprechenden Plasmiden zur Produktion der PGAs genutzt. Aus den nach Zentrifugation und Filtration erhaltenen zellfreien Kulturüberständen wurden die PGAs durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. HP 7 ($\alpha_{FJAT} - \beta_{Bt}$), HP 10 ($\alpha_{Bt} - \beta_{FJAT}$), HP 22 ($\alpha_{FJAT} - \beta_{Bm}$) und HP 23 ($\alpha_{Bm} - \beta_{FJAT}$), M (Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific) (Mayer et al. 2019).

Insgesamt ließ sich ein leicht versetztes Laufverhalten der α - bzw. β -Untereinheiten aus verschiedenen Spezies beobachten, obwohl die berechneten Massen der α -Untereinheiten nahezu identisch sind. Dieses unterschiedliche Laufverhalten könnte trotz sehr ähnlicher Größen der Untereinheiten durch unterschiedliche Oberflächenladungen zustande kommen (siehe Abbildung 29). Möglicherweise können diese Ladungen nicht komplett durch SDS überdeckt werden und führen so zu unterschiedlichen Formen des denaturierten Proteins und folglich zu unterschiedlichem Laufverhalten. Hierdurch kann erkannt werden, welche Untereinheit von welcher ursprünglichen PGA stammte. Beispielsweise lief die α -Untereinheit der BmPGA am weitesten durch das SDS-Gel, was auch bei HP 23 zu beobachten war, während die β -Untereinheit der BtPGA am größten erschien, wie auch bei HP 7 sichtbar war. Auffällig war ebenfalls, dass die α -Untereinheiten von HP 7 und HP 22 beide von der FJAT-PGA stammten, aber laut Laufverhalten im SDS-Gel unterschiedliche Größen aufwiesen, die ober- bzw. unterhalb der α -Untereinheit der nativen FJAT-PGA lagen. Möglicherweise wurde bei der HP 22 der Linker nicht abgespalten. Der Linker hat eine Größe von etwa 3,4 kDa. Dies würde ungefähr mit der Verschiebung der Bande der α -Untereinheit zusammenpassen. Bei HP 7 stammt der Linker aus der FJAT-PGA und bei HP 22 aus der BmPGA. Möglicherweise konnte der Linker bei HP 22 nur einseitig gespalten werden, da α -Untereinheit und Linker aus zwei verschiedenen Spezies stammten und so möglicherweise das Signal für die autokatalytische Prozessierung nicht genau übereinstimmte. Bei HP 7 stammten Linker und α -Untereinheit beide aus der FJAT-PGA (Abbildung 43).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle produzierten Hybrid-PGAs aktiv waren (Tabelle 31). Die spezifischen Aktivitäten von HP 7, HP 10 und HP 22 befanden sich dabei mit 11,6 bis 14,0 U/mg in einem ähnlichen Bereich wie die drei Wildtyp-Varianten (10,6 bis 13,7 U/mg). Im Gegensatz dazu

zeigte HP 23, die wie HP 22 aus Bm- und FJAT-PGA besteht, mit 7,2 U/mg eine vergleichsweise niedrige spezifische Aktivität. Falls die Spaltung des Linkers von der α -Untereinheit der HP 22 tatsächlich, wie oben diskutiert, nicht vollständig war, wurde die Aktivität dadurch nicht eingeschränkt. Dies wäre theoretisch möglich, da sich das katalytisch aktive Serin am N-Terminus der β -Untereinheit befindet, wo laut Laufverhalten auf dem SDS-Gel eine Spaltung stattfand.

Tabelle 31: Zusammensetzung, Schmelztemperatur T_m und spezifische Aktivität der Hybrid-PGAs nach Ionenaustauschchromatographie.

PGA	Zusammensetzung	Spezifische Aktivität [U/mg] ^a	T_m [°C] ^b
HP 7	$\alpha_{FJAT} - \beta_{Bt}$ Linker FJAT	$12,7 \pm 0,5$	$70,8 \pm 0,3$
HP 10	$\alpha_{Bt} - \beta_{FJAT}$ Linker FJAT	$11,6 \pm 0,4$	$71,4 \pm 0,1$
HP 22	$\alpha_{FJAT} - \beta_{Bm}$ Linker Bm	$14,0 \pm 0,2$	$57,1 \pm 0,1$
HP 23	$\alpha_{Bm} - \beta_{FJAT}$ Linker FJAT	$7,2 \pm 0,3$	$63,3 \pm 0,4$

^a Die Aktivität wurde unter Standardbedingungen bei 37 °C und pH 7,5 mit dem Substratanalog NIPAB bestimmt.

^b Der Thermal Shift Assay wurde in folgenden Puffern durchgeführt: 40 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl (HP 7), 20 mM Tris HCl pH 8 (HP 10 und 22), 40 mM HEPES pH 7 (HP 23).

Die Schmelzpunkte der Fusionsproteine lagen immer zwischen denen der nativen PGAs, aus denen sie zusammengesetzt sind (Tabelle 31). Bei HP 7 und 10, beides Hybride aus FJAT- und BtPGA, lagen beide Schmelzpunkte mit 70,8 °C bzw. 71,4 °C zwischen den beiden Schmelzpunkten der ursprünglichen FJAT-PGA (73,3 °C) und BtPGA (64,5 °C). Die Schmelzpunkte der beiden Hybrid-PGAs lagen dabei aber deutlich näher an dem der FJAT-PGA, obwohl bei der HP 7 nur die kleinere α -Untereinheit und bei HP 10 die größere β -Untereinheit aus der FJAT-PGA stammte. Da somit beide Hybrid-PGAs trotz unterschiedlicher Zusammensetzung eine ähnliche Thermostabilität aufwiesen, ließen sich hieraus keine Rückschlüsse über den Einfluss einzelner Untereinheiten ableiten.

HP 22 und HP 23 bestanden jeweils aus Untereinheiten von FJAT- und BmPGA. Ihre Schmelzpunkte (57,1 bzw. 63,3 °C) lagen auch zwischen denen dieser beiden PGAs, allerdings diesmal deutlich näher am Schmelzpunkt der BmPGA (56,8 °C). Die Schmelztemperatur der HP 22 glich mit 57,1 °C fast der der BmPGA. Bei der HP 23 lag der Schmelzpunkt 6,5 °C über dem der BmPGA, aber 10 °C unter dem der FJAT-PGA, obwohl die deutlich größere β -Untereinheit von der stabileren FJAT-PGA stammte. Scheinbar hatte die BmPGA, unabhängig von der Größe der jeweils eingefügten Untereinheit, größeren Einfluss auf die Thermostabilität als die FJAT-PGA. Insgesamt konnten somit keine Rückschlüsse über den Einfluss der einzelnen Untereinheiten auf die Thermostabilität gezogen werden. Diese hängt wahrscheinlich von einem Zusammenspiel verschiedener einzelner Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, Salzbrücken oder hydrophoben Wechselwirkungen ab.

Weil die Zusammensetzung von Hybriden aus ähnlichen PGAs zu aktiven Enzymen gut funktioniert hat, sollten nun neben Hybriden aus FJAT- und BtPGA sowie FJAT- und BmPGA weiterhin Fusionsproteine aus der PGA aus *E. coli* (EcPGA) und FJAT-, Bt- bzw. BmPGA hergestellt werden. Dazu wurde das Gen der EcPGA synthetisch mit einer auf *B. megaterium* angepassten Codon Usage sowie dem N-terminalen Signalpeptid von BmPGA hergestellt, um die Sekretierbarkeit mit *B. megaterium* zu gewährleisten. Anschließend wurden *hybridpga*-Gene, wie oben beschrieben, durch PCR-Amplifikation der einzelnen Untereinheiten hergestellt, in den Vektor p3STOP1623hp kloniert und *B. megaterium* MS941 damit transformiert. Allerdings konnten alle unterschiedlichen Hybrid-PGAs mit *E. coli*-Anteilen trotz Bestätigung der Sequenz durch DNA-Sequenzierung weder produziert noch sekretiert werden.

Sowohl bei Analyse der extra- als auch der intrazellulären Proteine konnten keine *E. coli*-Hybrid-PGAs identifiziert werden, obwohl die Codonverwendung der EcPGA auf *B. megaterium* MS941 angepasst und das BmPGA-Signalpeptid verwendet wurde. Ein möglicher Grund, dass die Hybride nicht produziert oder sekretiert werden konnten, ist, dass PGAs aus Gram-positiven Bakterien und die EcPGA möglicherweise trotz ähnlicher Struktur zu unterschiedlich sind. Während die erfolgreich kombinierten PGAs aus Gram-positiven Bakterien eine Sequenzidentität von etwa 75 % aufweisen, haben Bm- und EcPGA nur eine Sequenzidentität von etwa 30 %. Außerdem ist es möglicherweise problematisch, dass die EcPGA in *E. coli* über den Tat-Weg sekretiert wird (Ignatova et al. 2002), während FJAT-, Bt- und BmPGA über den Sec-Weg in *B. megaterium* exportiert werden. Proteine, die über den Sec-Weg exportiert werden, liegen vor der Translokation ungefaltet vor und werden erst außerhalb des Cytoplasmas gefaltet, während Proteine, die über den Tat-Weg exportiert werden, sich schon im Cytoplasma falten (Freudl 2018). Falls in den EcPGA-Untereinheiten Signale für die Faltung innerhalb der Zelle vorlagen, könnte dies zu Problemen geführt haben.

Zusammenfassend konnten funktionale Hybrid-PGAs aus FJAT-PGA und Bt- oder BmPGA erfolgreich produziert, sekretiert, prozessiert und gereinigt werden. Die Hybride zeigten ähnliche spezifische PGA-Aktivitäten wie die Ausgangsenzyme. Mithilfe des Austauschs von Untereinheiten konnte jeweils der Schmelzpunkt der weniger thermostabilen PGA erhöht, allerdings die Thermostabilität nicht über die Schmelztemperatur der stabilsten FJAT-PGA gesteigert werden. In der Literatur konnten ähnliche Beobachtungen beispielsweise bei der Herstellung von Hybriden aus thermophilen und mesophilen Endoglucanase gemacht werden. Dabei konnten auch die Temperaturoptima und Halbwertszeit der mesophilen Endoglucanase verbessert werden, aber nicht über die Optima der thermostabilen Variante hinaus. Dazu wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verbesserte hydrophobe Packung an der Grenzfläche die Thermostabilität der Hybride in Bezug auf die mesophile Ausgangsvariante verbessert haben (Zheng et al. 2018). Bei einer chimären Cellobiohydrolase konnte eine erhöhte Aktivität bei gleichbleibender Thermostabilität festgestellt werden (Voutilainen et al. 2014). Bei Untersuchungen der α -Amylase aus *Bacillus acidicola*, die mit der N- und C-terminalen Region des thermostabilen α -Amylase-Gens von *Geobacillus thermoleovorans* fusioniert wurde, wurde eine erhöhte katalytische Effizienz und Thermostabilität bestimmt (Parashar and Satyanarayana 2016).

Bisher konnten die Effekte bei den meisten Studien allerdings nicht mit eindeutigen strukturellen Daten erklärt werden. Durch Identifikation von Bereichen oder Aminosäuren, die die Thermostabilität vermitteln, könnten diese direkt ausgetauscht und so die Thermostabilität gezielt erhöht werden. Da diese Bereiche bislang nicht zuverlässig vorhergesagt werden können, besteht nur die Möglichkeit, zufällig Veränderungen einzufügen und nach verbesserten Varianten zu screenen. Beispielsweise könnten Bereiche verschiedener PGAs durch Gene-Shuffling miteinander vermischt werden. Dies wurde bereits mit den PGAs aus *E. coli*, *K. citrophila* und *P. rettgeri* durchgeführt. Dabei konnte eine Hybrid-PGA mit Anteilen aus Ec- und KcPGA und zusätzlichen Punktmutationen erhalten werden, die zu einer verbesserten Synthese von Ampicillin, Amoxicillin und Cefalexin führte (Jager et al. 2007). Dieser Ansatz könnte in Zukunft auch für die hier beschriebenen FJAT-, Bt- und BmPGA getestet werden.

4.6.2 Erstellung und Charakterisierung von Single-chain PGAs

Nach der Analyse der Hybrid-PGAs sollten nun Single-chain PGAs durch kovalente Verknüpfung der homologen Untereinheiten hergestellt werden, bei denen nach dem Export keine Spaltung in α - und β -Untereinheit stattfindet, sondern die Untereinheiten über einen Polypeptidlinker verbunden bleiben. Durch die monomere Struktur sollte so eine Steigerung der thermischen und mechanischen Stabilität der PGAs im Gegensatz zur dimeren Form erreicht werden. Bereits zuvor wurde eine funktionale Single-chain EcPGA hergestellt (Flores et al. 2004), die aber nicht im Hinblick auf ihre Stabilität untersucht wurde.

Zur Konstruktion eines Monomers ist eine kovalente Verbindung der beiden Untereinheiten nötig. Bei Betrachtung der FJAT-PGA-Struktur (Abbildung 45) wurde deutlich, dass der C-Terminus der α -Untereinheit und der N-Terminus der β -Untereinheit, welche auf genetischer Ebene durch die 93 bp lange Linkersequenz verbunden sind, in der Struktur sehr weit voneinander entfernt liegen, da der 31 Aminosäuren lange Linker autokatalytisch entfernt wurde. Im Präproprotein blockiert dieser Linker noch das aktive Zentrum und wird erst nach dem Export entfernt, sodass das aktive Zentrum freigegeben wird (Hewitt et al. 2000). Dahingegen liegen die in der mRNA am weitesten voneinander getrennten Termini, der N-Terminus der α -Untereinheit und der C-Terminus der β -Untereinheit, in der dreidimensionalen Struktur relativ nah beieinander. Dadurch wurden diese für eine kovalente Verbindung mithilfe eines artifiziellen Linkers gewählt.

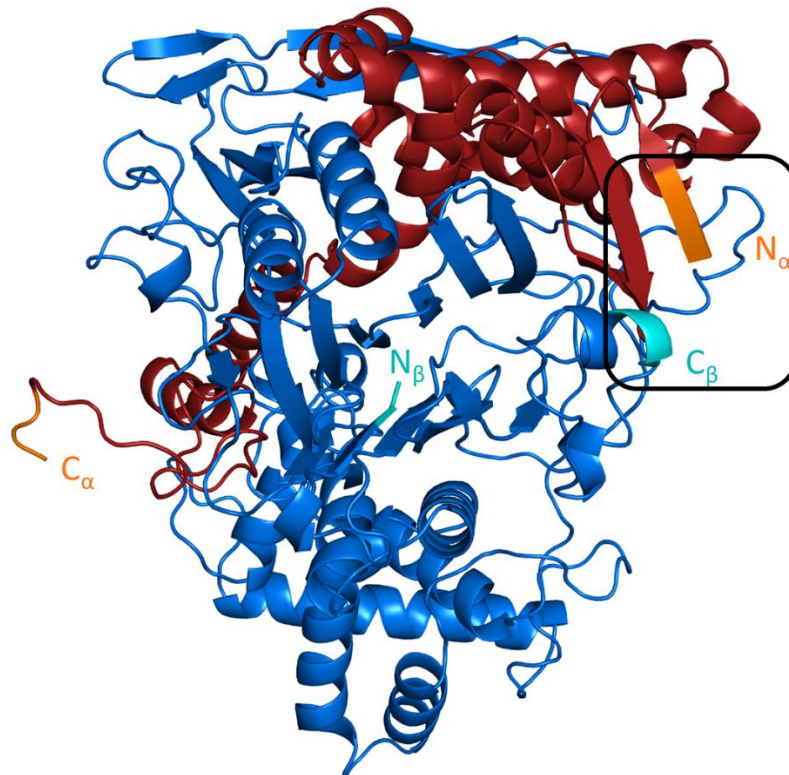


Abbildung 45: FJAT-PGA Struktur mit hervorgehobenen N- und C-Termini. Die α -Untereinheit ist in rot dargestellt und deren N- und C-Terminus sind in orange hervorgehoben. Die β -Untereinheit ist blau gefärbt und deren N- und C-Terminus sind in cyan markiert. Die schwarze Box zeigt die Termini, die bei der Herstellung der single-chain PGAs verbunden wurden.

Zunächst wurde ein aus den vier Aminosäuren GARD bestehender Linker gewählt, der bereits in einer funktionalen Single-chain EcPGA genutzt wurde (Flores et al. 2004). Dadurch ergab sich für die Single-chain PGAs auf genetischer Ebene eine geänderte Abfolge der Untereinheiten. Nach der codierenden Sequenz für das Signalpeptid folgt die der β -Untereinheit, die des artifiziellen Linkers GARD und dann die der α -Untereinheit.

Zur Konstruktion der Single-chain PGAs wurden die jeweiligen PGA-Untereinheiten durch PCR amplifiziert und in umgekehrter Reihenfolge durch überlappende Überhänge verbunden. Der Linker GARD wurde durch den Primer eingefügt. Die *singlechainpga*-Gene wurden in den Vektor pSPLipAhp integriert (Stammen et al. 2010), der bereits die korrespondierende Sequenz des Signalpeptids der Lipase A aus *B. megaterium* enthält, welches für viele rekombinante Proteine zur Sekretion in *B. megaterium* genutzt wurde (Yang et al. 2006; Biedendieck et al. 2007; Yang et al. 2007). So ergaben sich Konstrukte, die die PräproPGAs SP_{LipA} - β -Untereinheit-Linker_{GARD}- α -Untereinheit codierten. *B. megaterium* MS941 wurde anschließend mit den entstandenen Plasmiden transformiert. Nach 24 h wurden die Proteine aus dem Überstand mit Ammoniumsulfat gefällt (Abbildung 46) und die Enzymaktivität mittels NIPAB-Assay im Überstand bestimmt. Durch SDS-PAGE-Analyse war die monomere Single-chain FJAT-PGA bei einer relativen molaren Masse von 90.000 erkennbar, während die Single-chains aus Bt- und BmPGA nicht sichtbar waren. Hier war bei 90 kDa nur eine dünne Bande zu erkennen, die auch in der Negativkontrolle vorkam. Das gleiche Ergebnis zeigte sich im NIPAB-Assay. Der Überstand aus der Single-chain FJAT-Produktion zeigte Aktivität (0,05 U/mL), während der Überstand der Leervektorkontrolle und die Single-chain Bt- und BmPGA-Überstände keine Aktivität aufwiesen. Die volumetrische PGA-Aktivität im Single-chain FJAT-PGA-Überstand zeigte nur etwa 10 % der Aktivität des FJAT-PGA Überstandes, weil diese in deutlich geringerer Menge als die Wildtyp-Variante produziert wurde. Warum die Single-chain PGAs aus Bt- und BmPGA nicht produziert wurden bzw. nicht aktiv waren, lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise kam es zu sterischen Hinderungen durch einen zu kurzen Linker, sodass die Proteine nicht richtig gefaltet und deshalb wieder abgebaut wurden.

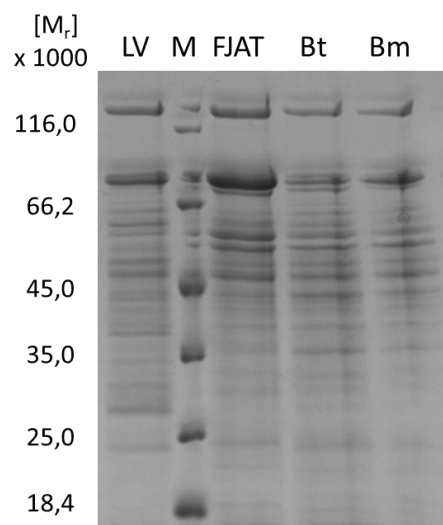


Abbildung 46: SDS-PAGE-Analyse der mit Ammoniumsulfat gefällten extrazellulären Proteine nach 24-stündiger Kultivierung der *B. megaterium* Stämme mit den Plasmiden zur Produktion von single-chain FJAT-, Bt- und BmPGA im Vergleich zu *B. megaterium* mit einer Leervektorkontrolle (LV) = p3STOP1623hp, M = Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific.

Aus diesem Grund wurde mit der Single-chain FJAT-PGA weitergearbeitet. Diese wurde zunächst mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Danach war die Single-chain FJAT-PGA als deutliche Bande bei einer relativen molaren Masse von 90.000 im SDS-Gel sichtbar und kaum weitere Proteine. Eine schwache Bande bei einer relativen molaren Masse von 60.000 könnte hier auf die β -Untereinheit hindeuten (Abbildung 47a). Die Messung des Schmelzpunktes mittels Thermal Shift Assay zeigte mit 75,6 °C eine signifikante Steigerung im Vergleich zu der des Wildtyps mit 73,3 °C. Die spezifische Aktivität betrug mit 8,9 U/mg etwa 65 % der spezifischen Aktivität der FJAT-PGA (13,7 U/mg). Die Single-chain PGA war somit etwas weniger aktiv, aber die Thermostabilität konnte um 2,3 °C im Vergleich zur FJAT-PGA gesteigert werden. Als nächstes wurde die Single-chain FJAT-PGA für eine mögliche Kristallisation über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Nach diesem Schritt war eine teilweise Spaltung der Single-chain FJAT-PGA in α - und β -Untereinheit im SDS-Gel zu beobachten (Abbildung 47b).

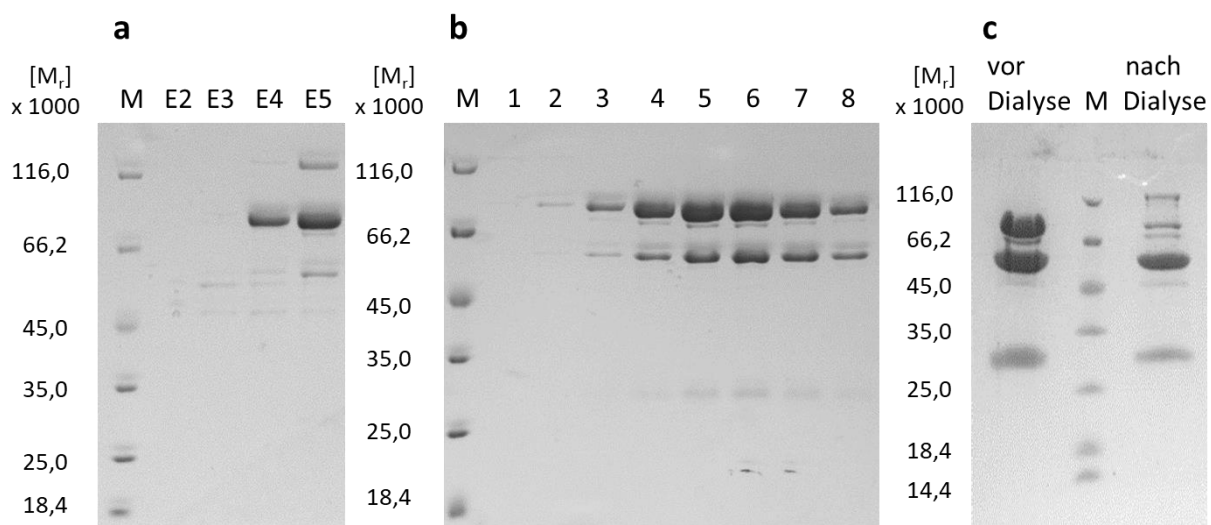


Abbildung 47: SDS-PAGE-Analysen der Single-chain FJAT-PGA. a) Elutionsfraktionen nach Kationenaustauschchromatographie, E2, E3, E4, E5 = Elutionsfraktionen mit 200 - 500 mM NaCl in 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) b) Elutionsfraktionen 1 - 8 nach Größenausschlusschromatographie, eluiert wurde mit 150 mM NaCl in 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) c) Single-chain FJAT-PGA vor und nach Dialyse gegen 10 mM HEPES-Puffer (pH 7).

Nach anschließender Dialyse gegen 10 mM HEPES-Puffer (pH 7), der hier für die Kristallisation von Proteinen genutzt wurde, war ein fast vollständiger Zerfall in die Untereinheiten erfolgt (Abbildung 47c). Der Zerfall der Single-chain in salzarmem HEPES-Puffer könnte zum einen daran liegen, dass durch den artifiziellen Linker der Abstand zwischen α - und β -Untereinheit im Vergleich zum Heterodimer verändert wurde. Dadurch könnte das Molekül „unter Spannung“ stehen oder dieser Bereich sehr flexibel sein, was beides mit der Zeit zu einem Zerfall führen könnte. Anhand der Röntgenstruktur ist dies nicht erklärbar, da die Struktur im Bereich der Termini nicht exakt lösbar war. Durch die hohe Flexibilität in diesen Bereichen war hier nur eine diffuse Elektronendichte erkennbar. Aber auch der Salzgehalt schien einen großen Einfluss auf die Spaltung der monomeren PGAs zu haben. Salze können mit der Proteinoberfläche interagieren, sodass sie die native Konformation stabilisieren. Durch den Wegfall dieser Interaktionen im salzarmen Puffer könnte eine geringere Stabilisierung und damit möglicherweise der Zerfall in die Untereinheiten begünstigt werden (Chi et al. 2003). Dieser Zerfall des Monomers in ein Heterodimer spiegelte sich auch bei Betrachtung der Thermostabilität vor

und nach Dialyse wider. Während als Schmelzpunkt vor der Dialyse noch 75,6 °C gemessen werden konnte, waren es danach noch 72,1 °C, was in etwa dem der FJAT-PGA entsprach. Diese Abnahme der Schmelztemperatur lässt sich mit dem Zerfall des Monomers in ein Heterodimer erklären.

Im Folgenden sollten nun stabilere Single-chain FJAT-PGAs konstruiert werden. Die verschiedenen Strategien dazu beinhalten die Variation der Linkerlänge, die Abspaltung von Aminosäuren am N-Terminus der α -Untereinheit bzw. am C-Terminus der β -Untereinheit und das Einfügen eines zusätzlichen Alanins am Ende des Signalpeptids. Mit der Variation der Linkerlänge (4 - 8 Aminosäuren) sollte der Zerfall der Single-chain PGAs durch einen möglicherweise zu kurzen Linker unterbunden werden. Durch Deletion von Aminosäuren am N $_{\alpha}$ -Terminus und am C $_{\beta}$ -Terminus, welche sich durch die umgekehrte Reihenfolge der Untereinheiten angrenzend an den artifiziellen Linker befanden, sollten die Flexibilität eingeschränkt und mögliche Spannungen im Protein verringert werden. Durch Identifikation des optimalen Abstandes zwischen α - und β -Untereinheit sollte so der Zerfall der Single-chain PGAs minimiert werden. Durch die Deletion von Aminosäuren an den Termini könnten ebenfalls potentiell vorhandene Spaltsignale für die Prozessierung entfernt werden. Die Insertion eines zusätzlichen Alanins am Ende des Signalpeptids sollte laut Vorhersage mit dem Tool SignalP (Petersen et al. 2011) zu einer besseren Abspaltung des Signalpeptids nach der Translokation führen und somit die Sekretionseffizienz erhöhen.

Insgesamt konnten neun weitere Single-chain PGAs (SC-PGAs) mit den Linkern GARD, GARDG, GARDGA oder GARDGARD erfolgreich hergestellt, produziert, sekretiert und gereinigt werden. Teilweise wurde ein zusätzliches Alanin eingefügt und bis zu acht Aminosäuren an den Termini deletiert. Zur Überprüfung der Stabilität wurde die Schmelztemperatur nach der Reinigung im salzhaltigen Elutionspuffer bestimmt, dann gegen 10 mM HEPES dialysiert und die Schmelztemperatur erneut bestimmt. Außerdem wurde die spezifische Enzymaktivität ermittelt (Tabelle 32). Die Überprüfung der Konformation vor und nach Dialyse erfolgte durch SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 48). Alle SC-PGAs konnten zumindest teilweise als Monomer produziert werden. Im SDS-Gel zeigte sich neben der Single-chain Bande bei einem M_r von etwa 90.000 bei den meisten SC-PGAs bereits nach der Reinigung ein teilweiser Zerfall in α - und β -Untereinheit bei relativen molaren Massen zwischen 25.000 und 30.000 bzw. 60.000. Nach der Dialyse gegen 10 mM HEPES-Puffer zeigte sich bei vielen SC-PGAs ein verstärkter Zerfall der Single-chain PGA in α - und β -Untereinheit. Außerdem ließ sich am SDS-Gel erkennen, dass die Reinigung bei den SC-PGAs unterschiedlich gut funktioniert hat. Bei allen SC-PGAs waren weitere, unidentifizierte Proteinbanden bei etwa 50 und 120 kDa in unterschiedlicher Stärke zu erkennen. Besonders SC 28 und 30 wiesen hier große Anteile anderer Proteine auf. Eine geringere Ausbeute dieser SC-PGAs bei der Produktion vergrößerte scheinbar den Anteil von gleich geladenen und so durch Ionenaustauschchromatographie mitgereinigten Wirtsproteinen. Auch die α -Untereinheiten schienen laut SDS-Gel in der Größe zu variieren, obwohl alle der FJAT-PGA entstammten. Meist liefen die α -Untereinheiten, die in Puffer mit hoher Salzkonzentration vorlagen, weiter durch das SDS-Gel und erschienen damit kleiner. Dies könnte zum einen an der bereits oben diskutierten geringeren Stabilität der Proteine in salzarmen Puffern liegen (Chi et al. 2003), durch die möglicherweise nicht an der Katalyse beteiligte Termini verkürzt werden. Zum anderen könnte das Laufverhalten der SC-PGAs im salzreichen Puffer auch von den hohen Salzkonzentrationen (450 mM) beeinflusst werden.

Tabelle 32: Zusammensetzung, Schmelztemperatur und spezifische Aktivitäten der Single-chain FJAT-PGAs, modifiziert nach Mayer et al. (2019).

PGA	Linker	Besonderheit	T _m [°C] nach Reinigung ^a	T _m [°C] nach Dialyse ^b	Spezifische Aktivität [U/mg]
SC 1	GARD		75,6	72,1	8,9
SC 25	GARDG		77,0	75,3	4,3
SC 26	GARDGA		75,7	74,9	7,1
SC 27	GARDGARD		77,0	75,2	6,2
SC 35	GARD	Aminosäuren αK1, αD2, βR537 und βK538 wurden entfernt	76,5	73,7	9,3
SC 37	GARD	Aminosäuren αK1, αD2, αQ3, αK4, βN535, βA536, βR537 und βK538 wurden entfernt	74,5	74,4	9,9
SC 38	GARDGA	Aminosäuren αK1, αD2, αQ3, αK4, βN535, βA536, βR537 und βK538 wurden entfernt	76,0	73,8	7,6
SC 4	GARD	Zusätzliches Alanin am Ende des Signalpeptids	76,0	72,6	6,9
SC 28	GARDG	Zusätzliches Alanin am Ende des Signalpeptids	75,5	73,5	7,8
SC 30	GARDGARD	Zusätzliches Alanin am Ende des Signalpeptids	71,3	n.d. ^c	8,7
FJAT-PGA		Wildtyp	73,3	72,5	13,7

^a Das Enzym lag im salzhaltigen Elutionspuffer (50 mM NaPh-Puffer pH 5,5 mit 400 mM NaCl) vor

^b Das Enzym lag im salzarmen Puffer (10 mM HEPES pH 7) vor,

^c n.d. = nicht detektierbar.

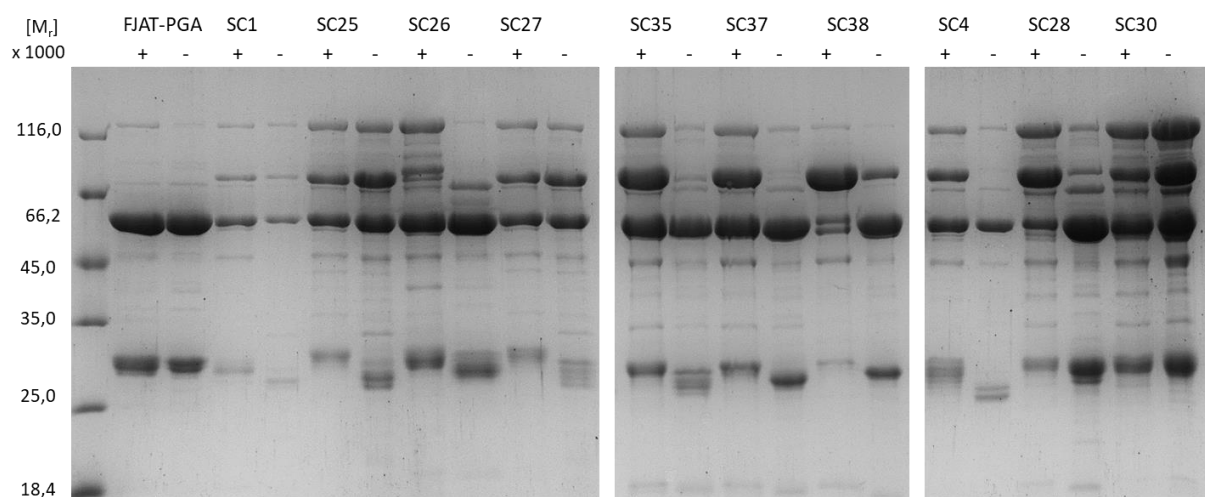


Abbildung 48: SDS-PAGE-Analyse von Single-chain FJAT-PGAs und der Wildtyp-FJAT-PGA in Puffern mit unterschiedlichem Salzgehalt. Jeweils 5 µg Protein in 50 mM NaPh-Puffer pH 5,5 mit 400 mM NaCl (+) oder 10 mM HEPES-Puffer pH 7 (-) sowie der Pierce™ Unstained Protein MW Marker (M, Thermo Scientific) wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Modifiziert nach Mayer et al. (2019).

Obwohl durch die Variationen der SC-PGAs noch keine komplett stabile Single-chain PGA gewonnen werden konnte, zeigten einige SC-PGAs (im Gemisch mit der heterodimeren Form) zumindest verbesserte Eigenschaften gegenüber der ersten Single-chain FJAT-PGA SC 1. Die unterschiedlichen Methoden wie die Variation der Linkerlänge, die Deletion terminaler Aminosäuren und das Einfügen eines Alanins am Ende des Signalpeptids hatten unterschiedlichen Einfluss auf die Stabilität bzw. Produktivität der SC-PGAs.

Durch Verlängerung des artifiziellen Linkers konnte bei SC 25 und SC 27 (Linker GARDG und GARDGARD) zum einen die Erhöhung der Schmelztemperatur auf 77 °C festgestellt werden. Dies ist mit + 3,7 °C gegenüber der FJAT-PGA (73,3 °C) und + 1,4 °C gegenüber der SC 1 die höchste gemessene Schmelztemperatur der SC-PGAs. Zum anderen lag der Anteil an Single-chain PGA bei den SCs 25 bis 27 nach der Dialyse genauso hoch wie vor der Dialyse im salzhaltigen Puffer und damit deutlich höher als bei den anderen SC-PGAs. Laut SDS-Gel lagen Single-chain und Heterodimer etwa in gleichen Anteilen vor. Dies wurde auch bei Betrachtung der Schmelztemperaturen dieser beiden SC-PGAs nach Dialyse bestätigt. Die Schmelztemperaturen lagen mit 74,9 bis 75,3 °C deutlich über den Werten der restlichen SC-PGAs und auch noch 2-3 °C über dem Wert der FJAT-PGA. Bei der SC 1 (Linker GARD) hatte sich die Schmelztemperatur nach Dialyse durch den Zerfall in die Untereinheiten der FJAT-PGA angeglichen.

Die Deletion von jeweils zwei (SC 35) bzw. vier (SC 37 und SC 38) Aminosäuren am N_α-Terminus und C_β-Terminus führte im salzhaltigen Puffer zum Vorliegen eines größeren Anteils an Single-chain PGA. Bei SC 38 konnte durch zusätzliche Verlängerung des Linkers (GARDGA) ein fast vollständiges Vorliegen eines Single-chain Monomers im salzhaltigen Puffer erreicht werden. Allerdings zerfielen diese SC-PGAs nach Dialyse zu großen Teilen in die heterodimere PGA-Form. Die Schmelztemperaturen von den SCs 35, 37 und 38 vor Dialyse entsprachen etwa der ursprünglichen SC 1. Nach Dialyse sanken auch die Schmelztemperaturen, lagen aber durch das Vorliegen eines kleinen Anteils an SC-PGA noch 0,4 bis 1,1 °C über dem Schmelzpunkt der FJAT-PGA.

Durch Einfügen eines Alanins am Ende des Signalpeptids sollte die Sekretionseffizienz und damit die Ausbeute der SC-PGAs erhöht werden. Allerdings zeigte sich an der PGA-Aktivität im zellfreien Überstand, dass dies nicht der Fall war. Beispielsweise lag die PGA-Aktivität im zellfreien Überstand von SC 4 mit 0,068 U/mL unter der von SC 1 mit 0,083 U/mL. SC 1 und SC 4 unterscheiden sich nur durch das eingefügte Alanin im Signalpeptid von SC 4, welches also eher zu einem verringerten Vorliegen von SC-PGA im Überstand führte. Durch den geringeren Anteil an SC-PGA lagen weitere Proteine in größerem Anteil vor, u. a. ein Protein mit einem M_r von 120.000 bei SC 28 und SC 30 (Abbildung 48). Dadurch konnte die Schmelztemperatur bei SC 30 kaum bestimmt werden. Durch das Vorkommen vieler Proteine in ähnlicher Konzentration überlagerten sich die Schmelzkurven und ließen keine Bestimmung eines Schmelzpunktes zu. Dies führte dazu, dass bei SC 30 die Schmelztemperatur vor Dialyse niedriger als die der FJAT-PGA und nach Dialyse nicht mehr messbar war, obwohl laut SDS-Gel auch ein Teil der Proteine als Monomer vorlag.

Insgesamt führte die Variation von Linkerlänge und Deletion von terminalen Aminosäuren zu teilweise stabileren SC-PGAs, während das Einfügen eines zusätzlichen Alanins eher negative Einflüsse auf die Produktivität und Stabilität dieser SC-PGAs hatte.

Alle Single-chain PGAs zeigten eine im Vergleich zum FJAT-PGA Wildtyp reduzierte spezifische Aktivität. Diese lag zwischen 4,3 und 9,9 U/mg und entsprach damit etwa 30 bis 70 % der Aktivität der FJAT-PGA (13,7 U/mg). Allerdings wurde bei Betrachtung des SDS-Gels auch deutlich, dass einige SC-PGAs deutlich schlechter gereinigt wurden als die FJAT-PGA und dadurch mehr zusätzliche Proteinbanden sichtbar waren (Abbildung 48). Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die volumetrische Aktivität durch die entsprechende Proteinkonzentration geteilt. Mit dem Bradford-Assay konnte nur eine Gesamt-Protein-Konzentration bestimmt werden und nicht nur die Konzentration der PGA. Deshalb wurde die PGA-Konzentration überschätzt und dadurch die spezifische Aktivität unterschätzt. Demnach unterschieden sich die spezifischen Aktivitäten vieler SC-PGAs wahrscheinlich nicht so stark von der des FJAT-PGA Wildtyps.

Auch in anderen Bereichen konnten bereits Single-chain Enzyme mit vielversprechenden Eigenschaften hergestellt werden. Beispielsweise wurde ein Antikörper-Fragment mit einem Enzym (scFv und alkalische Phosphatase) verbunden. Durch SDS-PAGE und colorimetrische Assays konnten die korrekte Faltung des Fusionsproteins, die Antikörperbindekapazität und die Enzymaktivität nachgewiesen werden. Mit diesem bifunktionalen Fusionsprotein kann Glykocholsäure, ein Biomarker für ein hepatozelluläres Karzinom und andere Lebererkrankungen, in einem Schritt nachgewiesen werden (Cui et al. 2018). Ähnlicher zu dieser Arbeit konnte das Homodimer der Endonuclease PvuII durch einen kurzen Peptidlinker bestehend aus den Aminosäuren GSGG kovalent zu einem Monomer verbunden werden. Die entstandene Single-chain Endonuclease konnte die gleiche Funktion mit nur leicht verringerter Aktivität gegenüber der homodimeren Endonuclease ausführen. Durch diese Anordnung ist es möglich nur eine Untereinheit des ursprünglichen Homodimers zu verändern und so ein heterodimeres Enzym zu erhalten. Anhand dieser Struktur sollten die DNA-Bindung und -Spaltung sowie Substratbindung und Katalyse dieser Endonuclease untersucht werden (Simoncsits et al. 2001). Allerdings gibt es bei diesen Single-chain Proteinen wie auch bei der Single-chain EcPGA (Flores et al. 2004) keine expliziten Angaben, ob die Stabilität der hergestellten Fusionsproteine über einen größeren Zeitraum und bei verschiedenen Bedingungen erhalten bleibt.

Schlussendlich konnte in dieser Arbeit keine über längere Zeit und in salzarmen Puffern stabile Single-chain PGA erzeugt werden. Dennoch konnte die anfängliche Hypothese bestätigt werden, dass die Thermostabilität durch kovalente Verbindung des Heterodimers zu einem Monomer gesteigert werden kann. Außerdem zeigten auch die monomeren PGAs trotz Verbindung mit einem artifiziellen Linker dem Wildtyp ähnliche Aktivitäten. Für weitere Versuche zur Konstruktion einer stabilen Single-chain PGA könnten verschiedene zufällige 4-Aminosäuren-Kombinationen als Linker getestet werden (Flores et al. 2004). Zusätzlich könnten längere Linker in Kombination mit fehlenden Aminosäuren am N_α-Terminus und C_β-Terminus überprüft werden. Dazu wäre auch die Entwicklung und Etablierung eines effizienteren Screeningverfahrens nötig, um die Vielzahl der entstehenden Varianten untersuchen zu können. Dies könnte beispielsweise durch einen Selektionsansatz, der auf einem Aktivitätstest mithilfe von Agarplatten oder Testpapier basiert (Zhang et al. 1986), oder einer Selektion basierend auf der erfolgreichen Spaltung von Penicillin G mittels des produzierten und funktionalen Enzyms geschehen (Flores et al. 2004).

Weitere Hinweise für mögliche Verbesserungen des Linkers zur Konstruktion stabiler Single-chain PGAs liefern bisherige Untersuchungen zum Einfluss von Länge und Zusammensetzung von Linkern anderer Single-chain Proteine. Es wurde festgestellt, dass die Aminosäure Glycin sich besonders gut als Bestandteil artifizieller Linker eignet, weil sie klein und ungeladen ist und durch Fehlen eines β -Kohlenstoffs zu einer größeren Flexibilität führt und somit Untereinheiten gut verbunden werden können. Daneben eingebaute Alanin- oder Serinreste sorgen für eine erhöhte Stabilität ohne die Flexibilität zu sehr einzuschränken (Robinson and Sauer 1998; Simoncsits et al. 2001). Der verwendete Linker für die Single-chain PGAs bestand aus Glycin, Alanin, Arginin und Asparaginsäure und damit bereits aus zwei empfohlenen Aminosäureresten. Für weitere Versuche könnten verschiedene Linkerversionen aus Glycin, Alanin und Serin getestet werden.

4.7 Protein Engineering zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA durch Verringerung der Oberflächenentropie

Neben der Erstellung von Fusionsproteinen gibt es eine Reihe computerbasierter Herangehensweisen zur Verbesserung von Enzymen auf genetischer Ebene. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit von Proteinen ist die Verringerung der Oberflächenentropie. Aminosäurereste mit hoher Konformationsentropie wie Lysin und Glutaminsäure an der Oberfläche von Proteinen können die Kristallisation dieser behindern. Lysine und Glutaminsäuren können durch eine große Anzahl an Konformationsmöglichkeiten wegen ihrer hohen Flexibilität schlechter in ein Kristallgitter geordnet werden. Es muss zunächst eine entropische Barriere überwunden werden, was Energie kostet. Des Weiteren können sterische oder elektrostatische Abstoßungen aufgrund der Größe und Ladung dieser Reste eine zusätzliche Hürde für die Kristallisation bedeuten. Durch kleine, ungeladene Aminosäurereste mit geringer Entropie wie Alanin wird daher die Bildung von Kristallkontakten thermodynamisch begünstigt (Cooper et al. 2007; Goldschmidt et al. 2007). Mithilfe des SERp Servers (engl. Surface Entropy Reduction prediction) können Aminosäurereste mit hoher Entropie an der Proteinoberfläche identifiziert werden. Durch Austausch dieser zu Alanin soll die Kristallisierbarkeit der Proteine verbessert werden (Goldschmidt et al. 2007). Möglicherweise werden durch die Reduktion der Oberflächenentropie zusätzlich der Kristallaufbau und die Wasserkanäle im Kristall verändert, was zu mechanisch stabileren CLECs führen könnte.

Für die Vorhersage mit dem SERp Server wurde die Aminosäuresequenz der FJAT-PGA genutzt. Basierend auf dieser wurden drei Cluster von je drei aufeinanderfolgenden Aminosäureresten identifiziert, deren Austausch zu einer verringerten Entropie führen sollte (Abbildung 49). Alle diese vorhergesagten Aminosäurereste befanden sich an der Oberfläche der FJAT-PGA. Die identifizierten fünf Lysine und vier Glutaminsäuren sollten durch die kleinere, ungeladene Aminosäure Alanin ersetzt werden. Die Austausche K201A, K202A und E203A in der α -Untereinheit werden dabei im Folgenden mit Cluster A1 abgekürzt, die Austausche K135A, E136A und K137A der β -Untereinheit als B1 und die Austausche K403A, E404A und E405A der β -Untereinheit als B2 (Abbildung 49).

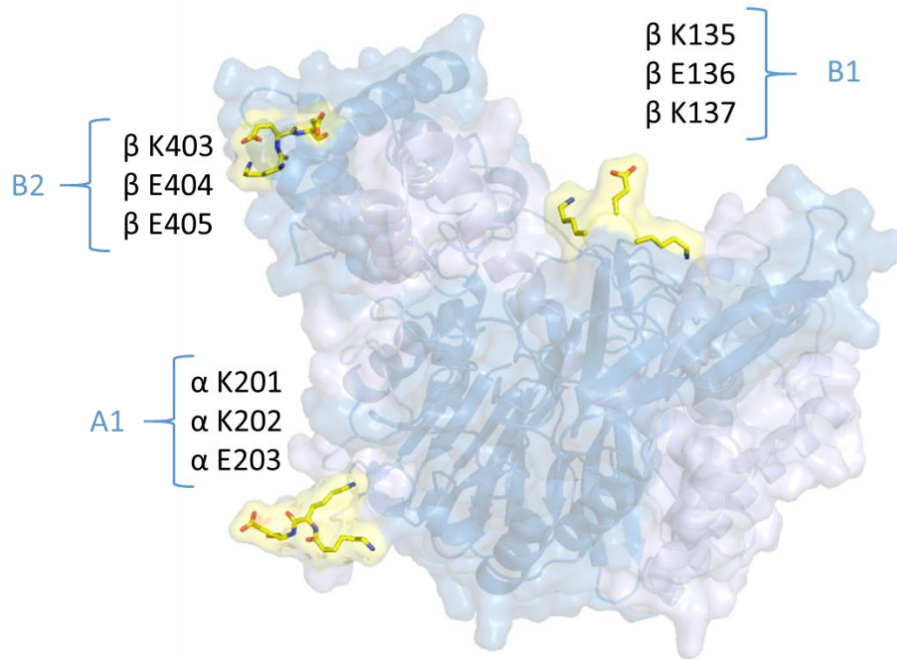


Abbildung 49: Aminosäurereste an der FJAT-PGA-Oberfläche, die zur Verringerung der Oberflächenentropie vom SERp-Server zur Substitution vorgeschlagen wurden (Goldschmidt et al. 2007). Entsprechende Reste sind gelb hervorgehoben, die α -Untereinheit ist in hellblau und die β -Untereinheit in mittelblau dargestellt. Die entsprechenden Cluster werden mit A1, B1 und B2 abgekürzt. Diese Abbildung wurde mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC) erstellt.

Die folgende Herstellung, Reinigung und Kristallisation der FJAT-PGA-Varianten wurde in Zusammenarbeit mit dem Masterstudenten Jan Wichmann durchgeführt (Wichmann 2020). Hergestellt wurden die FJAT-PGA-Varianten A1, B1 bzw. B2 mit jeweils einem veränderten Cluster, die Variante A1+B2 mit zwei veränderten Clustern und die Variante A1+B1+B2, in der alle drei Cluster verändert wurden. Mithilfe der QuikChange™ Methode wurden hierfür jeweils die drei Codons eines Clusters durch drei für Alanin codierende GCA-Codons ersetzt. Bei Varianten mit zwei oder drei veränderten Clustern, wurden bereits veränderte Plasmide erneut einer QuikChange™ Mutagenese unterzogen. Der Erfolg der Austausche wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Nach Transformation von *B. megaterium* MS941 wurden die Varianten A1, B1, B2, A1+B2 und A1+B1+B2 produziert und sekretiert, um die produzierten Mengen und die Aktivität der Varianten zu testen, die für das weitere Vorgehen essentiell waren. Dazu wurden die PGA-Varianten mit Ammoniumsulfat aus dem Kulturüberstand gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert sowie deren Aktivität im Kulturüberstand mithilfe des NIPAB-Assay bestimmt (Abbildung 50). Bei allen FJAT-PGA-Varianten waren die charakteristischen Banden für α - und β -Untereinheit der PGA bei relativen molekularen Massen von etwa 30.000 und 60.000 sichtbar. Bei der α -Untereinheit ließ sich auch, wie oben bereits diskutiert, ein leicht unterschiedliches Laufverhalten beobachten. Die Menge der sekretierten PGAs entsprach der des FJAT-PGA-Wildtyps, sodass ausreichende Mengen für Reinigung und Kristallisation produziert werden konnten. Außerdem zeigten die an der Oberfläche veränderten Varianten eine ähnliche oder leicht höhere volumetrische Aktivität verglichen mit dem Wildtyp.

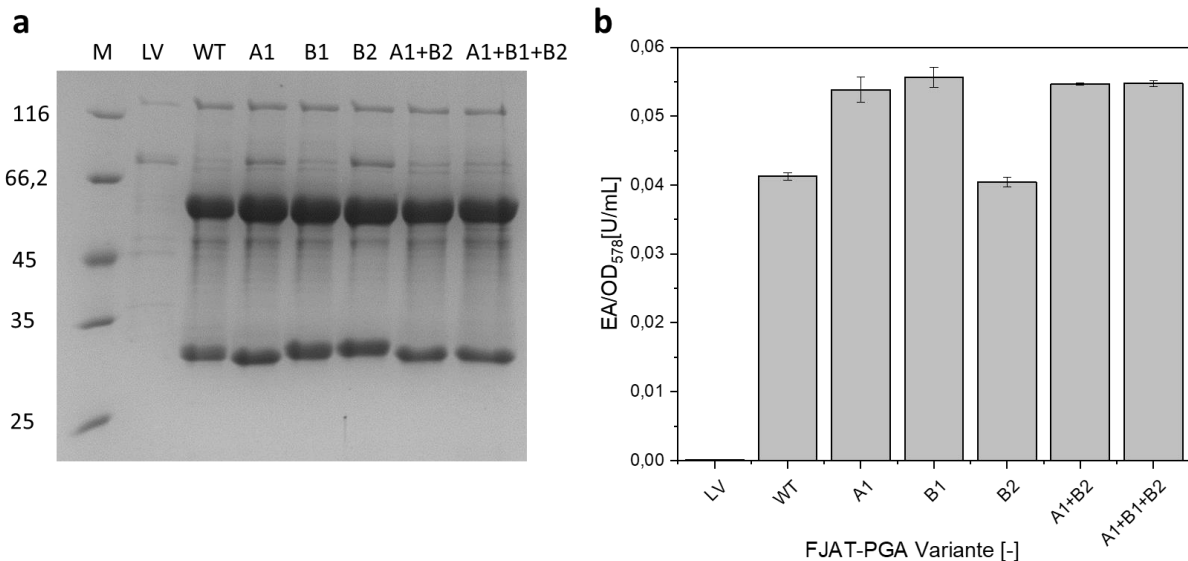


Abbildung 50: Rekombinante Produktion der SER-FJAT-Varianten in *B. megaterium* MS941: a) SDS-PAGE der nach 24 h mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine aus dem zellfreien Überstand. b) Auf die Biomasse (bestimmt durch die OD₅₇₈) normierte PGA-Aktivität nach 24 h im zellfreien Überstand. Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, modifiziert nach (Wichmann 2020).

Als nächstes wurden die Varianten B1, A1+B2 und A1+B1+B2 über Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Beispielhaft ist hier die Analyse der Reinigung der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 gezeigt (Abbildung 51).

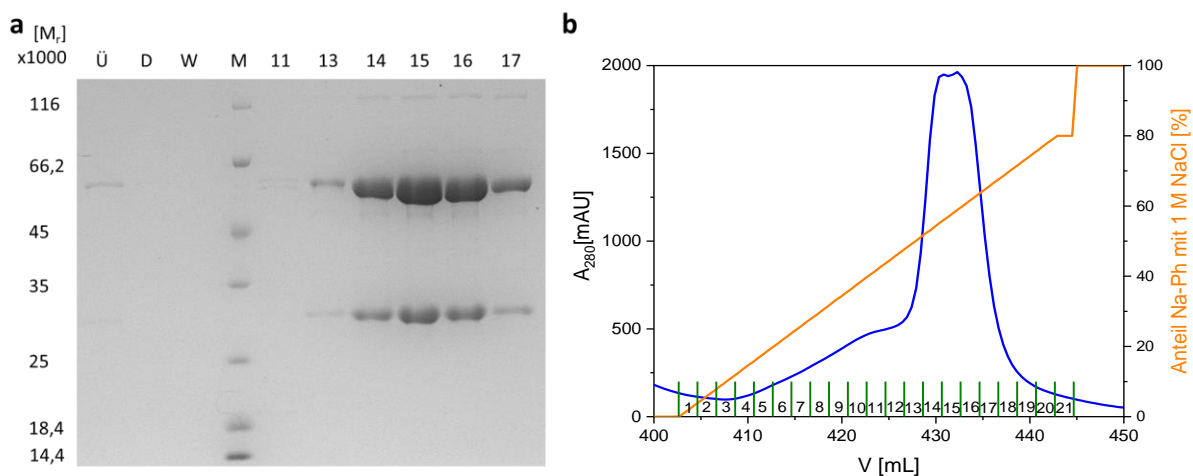


Abbildung 51: Reinigung der FJAT-PGA Variante A1+B1+B2 durch Kationenaustauschchromatographie mithilfe eines FPLC-Systems. Nach 24 h Kultivierung wurden 300 mL Kulturüberstand mithilfe einer Probenpumpe über eine 5 mL HiTrap™ SP FF Säule gegeben und durch einen linearen Gradienten von 0 bis 800 mM NaCl über 8 SV eluiert. a) SDS-PAGE der Reinigungsfractionen mit Kulturüberstand (Ü), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W) und Elutionsfraktionen 11 bis 17. b) Absorptionsmessung bei 280 nm der während der Elution. Die Elutionsfraktionen sind durch die grünen Abtrennungen markiert.

α- und β-Untereinheit waren im SDS-Gel bei etwa 30 und 60 kDa in den Fraktionen 13 bis 17 sichtbar. Bei der Absorption bei 280 nm war ein zusätzlicher Vorpeak sichtbar, der in einen Hauptpeak überging. Die Analyse der Fraktion 11 aus diesem Vorpeak zeigte, dass sich dort wenig bis keine PGA befand, sondern wahrscheinlich kleinere Proteine verschiedener Größe. Dagegen waren im Hauptpeak (Fraktionen 13 bis 17) die Banden der Untereinheiten der PGA deutlich sichtbar. Diese Fraktionen wurden nun zur Weiterverarbeitung vereinigt und konzentriert. Die spezifischen Aktivitäten der

Varianten B1, A1+B2 und A1+B1+B2 ähnelten mit 12,25 U/mg, 12,19 U/mg bzw. 12,33 U/mg der spezifischen Aktivität der FJAT-PGA (13,7 U/mg). Die Schmelzpunkte entsprachen ebenfalls denen der FJAT-PGA. Die hohe Thermostabilität blieb also erhalten, obwohl polare Aminosäurereste an der Oberfläche der Proteine entfernt wurden.

Für die Kristallisation wurden die Elutionsfraktionen konzentriert und in 10 mM HEPES (pH 7) umgepuffert. Zunächst wurde mit der Kristallisation der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 begonnen, da hier die größten Veränderungen in der Kristallisierbarkeit erwartet wurden. Als Ausgangspunkt wurden Kristallisationsbedingungen genutzt, die bereits bei der FJAT-PGA zu Kristallwachstum geführt haben (100 mM HEPES pH 7,5 mit 10 % (w/v) PEG 8000), da sich die Varianten in der vorangegangenen Charakterisierung kaum vom Wildtyp unterschieden haben. Es wurden verschiedene Bedingungen mit leichten Modifikationen der Konzentrationen von PGA und PEG 8000 sowie des Mischungsverhältnisses mit der Hanging-Drop-Methode der Dampfdiffusion getestet.

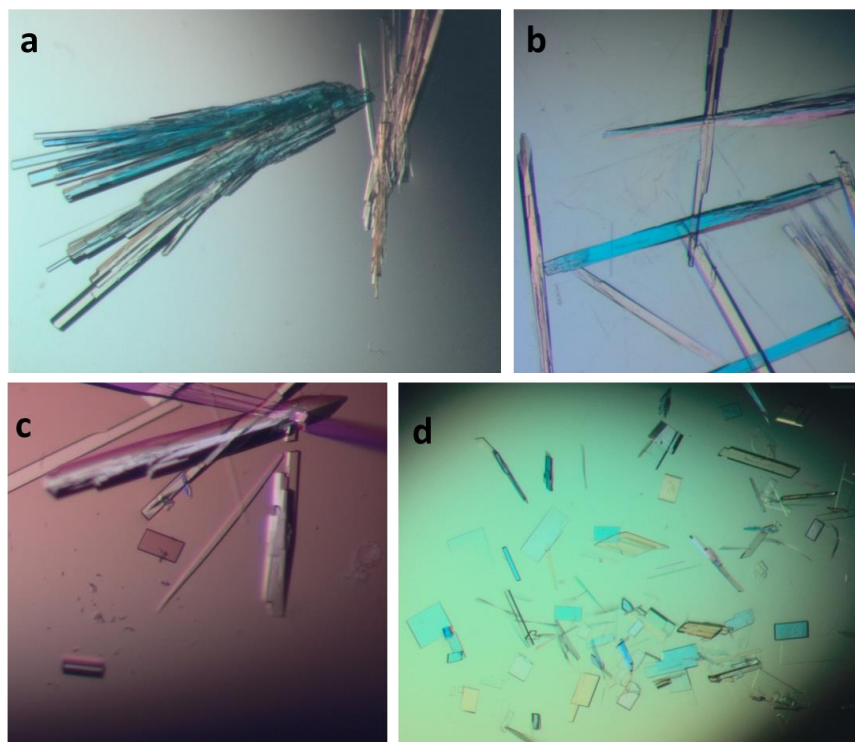


Abbildung 52: Dampfdiffusionskristallisation der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 im Hanging Drop-Verfahren bei 21 °C. Alle Kristallisationspuffer enthielten 100 mM HEPES pH 7,5 und 8 % (w/v) PEG 8000. Proteinkonzentration und Zusammensetzung (Angabe in μL) aus Kristallisationspuffer (KP), Protein (P) in 10 mM HEPES pH 7 und u.U. Seeds (S) variierten. a) 10 mg/mL Protein, KP:P 5:5 b) 8 mg/mL Protein, KP:P:S 4:4:2, Seeds aus stäbchenförmigen Kristallen c) 8 mg/mL Protein, KP:P:S 4:4:2, Seeds aus stäbchenförmigen Kristallen d) 8 mg/mL Protein, KP:P:S 4:4:2, Seeds aus quaderförmigen Kristallen. Modifiziert nach Wichmann (2020).

Während es beim Wildtyp teilweise mehrere Tage gedauert hat bis Kristalle gewachsen waren, zeigten sich bei der Variante A1+B1+B2 mit drei veränderten Clustern bereits nach einem Tag große Kristalle (Abbildung 52a). Allerdings waren diese stäbchenförmig und zu Sträußen zusammengewachsen, was sowohl für eine AFM-Messung als auch die Röntgenstrukturanalyse ungünstig war. Für die AFM-Messung sollten die Kristalle möglichst ebene Flächen haben und für die Röntgenstrukturanalyse als Einkristall, der ein durchgehendes, einheitliches Kristallgitter aufweist, vorliegen. Deshalb wurde Seeding, also die Zugabe von Kristallbruchstücken als Nukleationskeime, verwendet, um vereinzelte Kristalle zu erhalten (Abbildung 52b). Diese wuchsen allerdings weiterhin leicht übereinander, waren

uneben und leicht verzweigt. Deswegen wurde durch iteratives Seeding versucht, die Kristalle weiter zu verbessern. Dazu wurden aus den Kristallen wiederholt Kristallbruchstücke hergestellt und diese erneut zur Kristallisation eingesetzt. Die besten Ergebnisse wurden mit Seeds aus frischen Kristallen erhalten (Wichmann 2020). Nach iterativem Seeding waren in einem Tropfen Kristalle mit zwei verschiedenen Morphologien in Form von Stäbchen und Quadern entstanden (Abbildung 52c). Diese quaderförmigen Kristalle würden sich am besten für Strukturaufklärung, AFM-Messungen und auch eine mögliche Anwendung als Biokatalysatoren in Form von CLECs eignen, weil kleine kompakte Kristalle Scherkräften wahrscheinlich am besten standhalten würden. Deshalb wurden aus diesen quaderförmigen Kristallen erneut Seeds hergestellt und für einen weiteren Kristallisationsansatz eingesetzt. Dabei entstanden bei einer PEG 8000-Konzentration von 8 % (w/v) erneut quaderförmige Kristalle. Dies zeigte, dass durch die Verwendung von Kristallbruchstücken die Kristallmorphologie beeinflusst werden konnte (Abbildung 52d). Beim Einsatz von 10 % (w/v) PEG 8000 war die Bildung von Quadern und kleineren Stäbchen zu beobachten. Die zusätzliche Entstehung von Stäbchen bei hohen PEG-Konzentrationen trotz der Nutzung von Quader-Seeds könnte durch spontane Nukleation zustande gekommen sein, da die Variante A1+B1+B2 sehr schnell Kristalle bildete. Dies zeigte sich auch bei einem weiteren Ansatz unter Zugabe hochkonzentrierter Stäbchen-Seedsuspension. Es bildeten sich bereits nach 15 bis 20 min Kristalle. Nach dieser kurzen Zeit konnte es noch keine so große Veränderung der Konzentrationen durch Dampfdiffusion gegeben haben. Daher schien die Kristallbildung durch Fällungskristallisation entstanden zu sein. Um dies erneut zu testen, wurden Proteinlösung der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2, Kristallisationspuffer und hochkonzentrierte Seedsuspension ohne Vorhandensein eines Reservoirs gemischt. Es bildeten sich bereits nach etwa fünf Minuten die ersten Kristalle und nach 12,5 bis 14 min war die Bildung der Kristalle weitestgehend abgeschlossen (Abbildung 53).

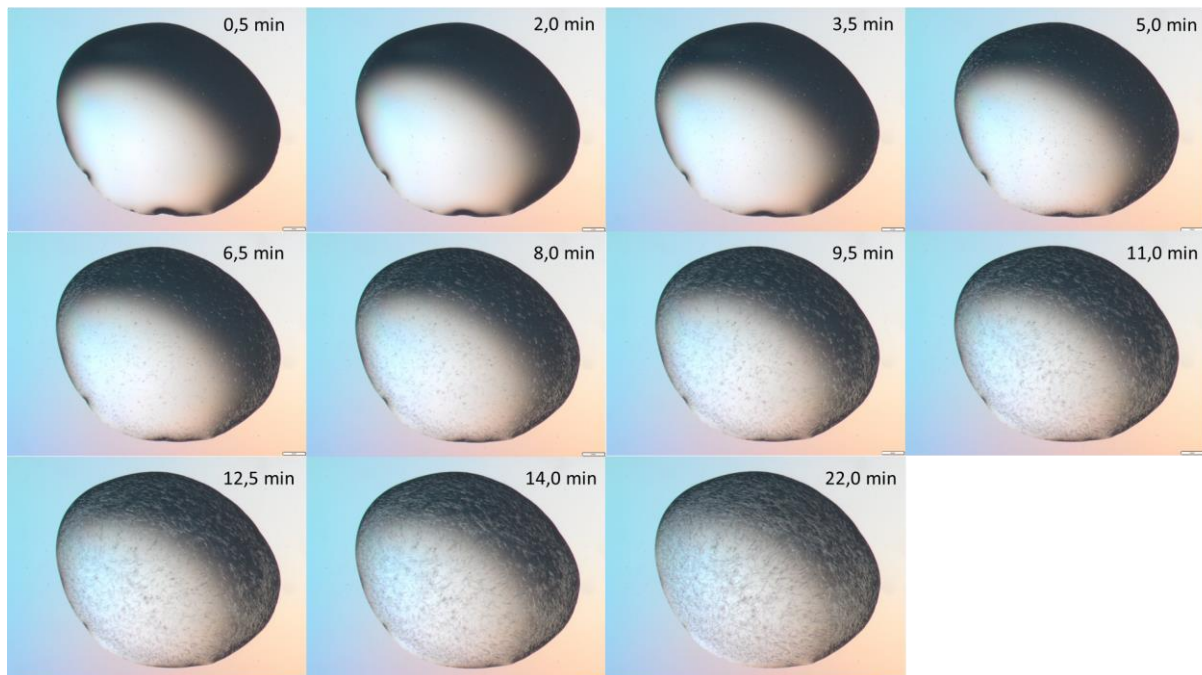


Abbildung 53: Kristallisation der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 ohne Reservoir. 4 μ L Kristallisationspuffer (100 mM HEPES pH 7,5 und 8 % (w/v) PEG 8000) wurden mit 4 μ L 8 mg/mL Proteinlösung in 10 mM HEPES pH 7 und 2 μ L Stäbchen-Seedsuspension gemischt und für 22 min bei 17 °C beobachtet (Wichmann 2020).

Damit konnte gezeigt werden, dass Kristalle der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 durch Fällungskristallisation gewonnen werden können. Dies bedeutet eine erhebliche Vereinfachung der Kristallisation, was auch eine Maßstabsvergrößerung erleichtern könnte. Um dies weiter zu untersuchen, wurden in einem Reaktionsgefäß die Lösung der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2, Kristallisationspuffer und konzentrierte Seedsuspension in einem Endvolumen von 500 μL gemischt. Innerhalb kurzer Zeit entstand eine große Menge an Kristallen (Abbildung 54). Die Kristallbildung wurde außerdem mikroskopisch beobachtet. Die Proben nach 80 min und 18 h wiesen kaum Unterschiede auf, sodass die Kristallisation wahrscheinlich bereits nach 80 min abgeschlossen war.

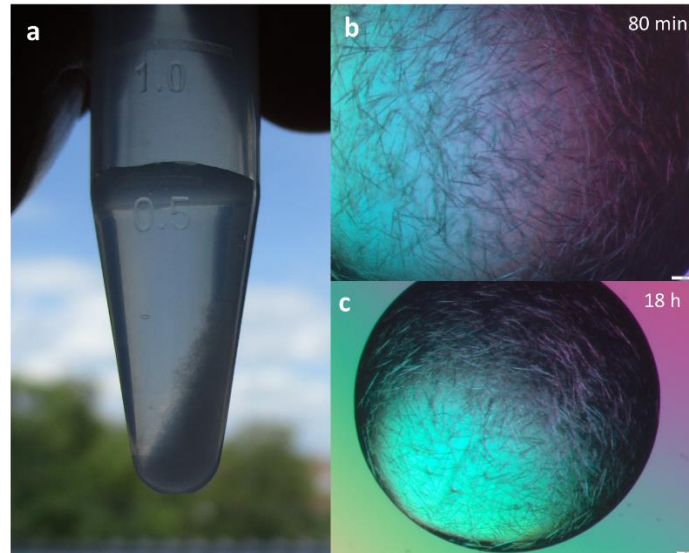


Abbildung 54: Fällungskristallisation der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 im 500 μL -Ansatz. 200 μL Kristallisationspuffer (100 mM HEPES pH 7,5 und 8 % (w/v) PEG 8000), wurden mit 200 μL 8 mg/mL Proteinlösung in 10 mM HEPES pH 7 und 100 μL konzentrierter Stäbchen-Seedsuspension gemischt (Wichmann 2020).

Dadurch können größere Mengen an Kristallen der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 gewonnen und eine mögliche biokatalytische Anwendung als CLECs ermöglicht werden. Umso mehr stellt sich daher die Frage, ob eine stabile Quervernetzung dieser Variante ähnlich wie bei dem FJAT-PGA Wildtyp möglich ist und ob die resultierenden CLECs aktiv sind. Dazu wurden die Kristalle im Reaktionsgefäß durch Zentrifugation sedimentiert, die Mutterlauge entfernt und die Kristalle mit Kristallisationspuffer gewaschen. Nach Zugabe der Quervernetzungslösung mit 5 % Glutaraldehyd wurde 24 h inkubiert, was bei der Wildtyp FJAT-PGA zu stabilen, aktiven CLECs geführt hat (Kapitel 4.5). Anschließend wurde die Lösung nach erneuter Zentrifugation wieder entfernt und die Kristalle mit Kristallisationspuffer gewaschen.

Der verwendete Quervernetzer Glutaraldehyd bindet und vernetzt vor allem Lysine, von denen bei der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 fünf an der Oberfläche entfernt wurden, um so erfolgreich die Kristallisierbarkeit zu verbessern. Um den Einfluss der fehlenden Lysinreste zu überprüfen, wurden unvernetzte Kristalle und CLECs in HEPES-Puffer gelagert. Dabei lösten sich die Kristalle nach kurzer Zeit auf, während die CLECs stabil in HEPES gelagert werden konnten. Die Quervernetzung war also trotz der Entfernung von fünf Lysinen erfolgreich, da an der Proteinoberfläche noch ausreichend Lysinreste zur Vernetzung vorlagen. Anschließend wurden die CLECs im NIPAB-Aktivitätsassay eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch die CLECs der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 aktiv waren. Allerdings konnten wie in Kapitel 4.5.3 noch keine quantitativen Werte im Vergleich zum

nativen Enzym erhalten werden. Durch eine weitere Maßstabsvergrößerung und Fällungskristallisation sollen zukünftig größere Mengen an CLECs daraufhin untersucht werden. Dann könnte die Masse der CLECs beispielsweise durch Wiegen bestimmt und so die spezifische Aktivität ermittelt werden.

Die Kristalle der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 wurden außerdem für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur verwendet. Dazu wurden die Aufnahme der Beugungsdaten und die Strukturaufklärung in Kooperation mit Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig). Es konnte eine Auflösung bis zu 1,93 Å erzielt werden. Die vollständigen Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung sind im Anhang dargestellt (Tabelle 37). Dabei zeigte sich, dass die FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 in der gleichen Raumgruppe $P2_12_12_1$ wie die FJAT-PGA kristallisierte. Jedoch unterschieden sich die Abmessungen der Einheitszellen deutlich (FJAT-PGA: 57,4 Å; 77,7 Å; 210,4 Å, FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2: 102,3 Å; 140,1 Å; 61,3 Å). Auch die Kristallkontakte waren bei Wildtyp FJAT-PGA-Kristallen und Kristallen der Variante A1+B1+B2 verschieden, was zu einer unterschiedlichen Anordnung der PGA-Heterodimere im Kristallgitter führte. Dies lässt sich verdeutlichen, indem das FJAT-PGA Wildtypenzym so zum Betrachter ausgerichtet wird, dass seine Symmetriepartner in einer 20 Å-Umgebung eine Ebene um das zentrale Heterodimer bilden, die sich davor und dahinter wiederholt. Wird die Ausrichtung des zentralen Heterodimers auf die FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 übertragen, ist erkennbar, dass die umliegenden Symmetriepartner in deren Kristallgitter aus diesem Winkel nicht die gleiche Ordnung zeigen (Abbildung 55).

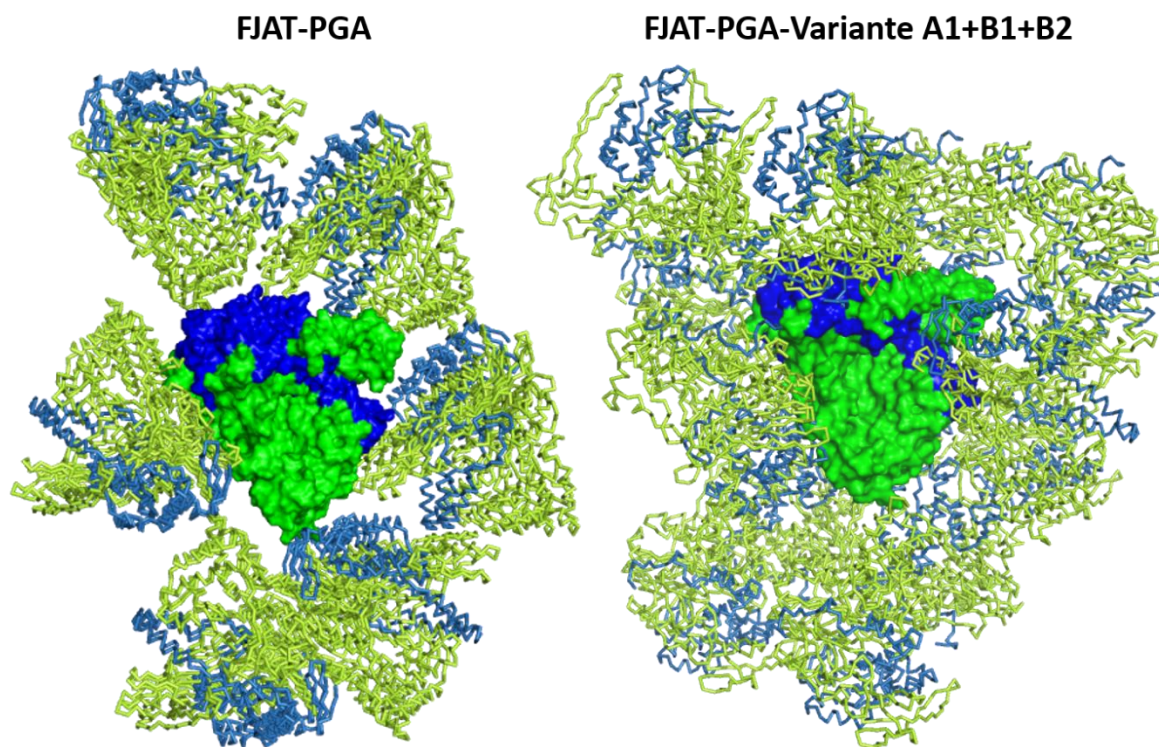


Abbildung 55: Anordnung von PGA-Heterodimeren in Kristallen von FJAT-PGA (PDB-Code 6NVX) und FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2. Die α -Untereinheiten sind jeweils in blau und die β -Untereinheiten in grün dargestellt. Beim zentralen Heterodimer ist die Oberfläche dargestellt. Dieses ist bei FJAT-PGA und FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 in gleicher Position orientiert. Die weiteren Heterodimere in einer 20 Å-Umgebung sind als Schleifen dargestellt. Diese Abbildung wurde mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC) erstellt. Die Strukturaufklärung der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 wurde von Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig).

Die Unterschiede in den Kristallkontakten beeinflussen die Kristallentstehung und Kristallisierbarkeit, sodass im Folgenden einige Kristallkontakte, die im Zusammenhang mit den eingefügten Veränderungen stehen, genauer betrachtet werden, um mögliche Erklärungen für die bessere Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA Variante A1+B1+B2 zu finden.

In der Wildtyp FJAT-PGA sind einige Aminosäurereste, welche durch die Methode zur Reduktion der Oberflächenentropie zum Austausch durch Alanin identifiziert wurden, an Kristallkontakten beteiligt. Dies sind zum einen die Aminosäurereste K201, K202 und E203 der α -Untereinheit, die als Cluster A1 zur Veränderung identifiziert wurden, und zum anderen die Aminosäuren E136 und K137 der β -Untereinheit, die Teil von Cluster B1 sind.

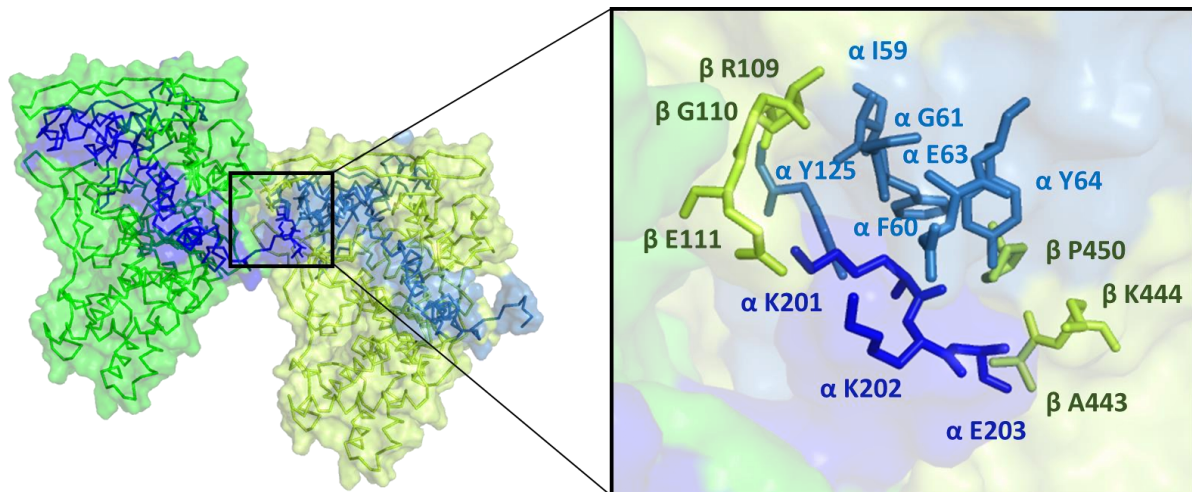


Abbildung 56: Kristallkontakt zwischen dem unveränderten Cluster A1 (α K201, K202 und E203) der α -Untereinheit (blau) der FJAT-PGA und einer weiteren symmetrieverwandten FJAT-PGA. Interagierende Aminosäuren sind in α - (hellblau) und β -Untereinheit (hellgrün) zu finden. Die α -Untereinheiten sind in blau bzw. hellblau dargestellt und die β -Untereinheiten in grün bzw. hellgrün. Die Strukturaufklärung der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 wurde von Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig).

Die Aminosäuren K201, K202 und E203 sind Teil eines flexiblen Loops, der etwas vom restlichen Heterodimer absteht und daher weit in ein benachbartes Heterodimer hineinragt. Dabei befinden sich die Lysin- und Glutaminsäurereste in räumlicher Nähe zu zwölf weiteren Aminosäureresten von α - und β -Untereinheit einer symmetrieverwandten FJAT-PGA, die eine Interaktion der Aminosäurereste erlauben könnte (Abbildung 56). Da die Aminosäuren K201, K202 und E203 allerdings sehr flexibel sind und mit sehr vielen Aminosäuren interagieren, ist dieser Kontakt wahrscheinlich entropisch schwer zu bilden. Es muss eine hohe Energiebarriere überwunden werden, um die geeigneten Positionen einzunehmen. Deshalb könnte dieser Kontakt für eine schnelle Kristallisation eher hinderlich sein. Dafür spricht auch, dass es in der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 an dieser Stelle wahrscheinlich keinen Kristallkontakt gibt. Zwar konnte der entsprechende Loop in der Struktur der FJAT-PGA-Variante ab Position α D199 aufgrund diffuser Elektronendichte wegen hoher Flexibilität nicht mehr eindeutig gelöst werden. Wenn aber ein Kontakt bestünde, der die Flexibilität einschränken würde, sollte dieser Kontakt auch sichtbar sein. Dadurch wurde hier vermutet, dass kein Kristallkontakt am veränderten Cluster A1 vorhanden ist. Die eingefügten Alanine besitzen mit einer Methylgruppe nur eine kleine ungeladene und neutrale Seitenkette, die wahrscheinlich nicht wie zuvor Lysin- und Glutaminsäurereste mit den entsprechenden Aminosäuren des symmetrieverwandten Heterodimers

interagieren können. Die Entfernung dieses entropisch schwierig zu bildenden Kontakts könnte also dazu beigetragen haben, dass die FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 besser kristallisiert.

Bedeutender als diese Veränderung im Cluster A1 könnten die Unterschiede im Kristallkontakt, an dem Cluster B1 beteiligt ist, sein. Hierzu konnten experimentell schon Hinweise gefunden werden. Neben der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 mit drei veränderten Clustern wurden auch die FJAT-PGA-Variante A1+B2 und die Variante B1 hergestellt, gereinigt und kristallisiert. Die Variante, bei der die Aminosäuren des Clusters B1 zu Alaninen verändert wurden, kristallisierte zwar schlechter als die FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2, aber deutlich besser als die Wildtyp FJAT-PGA, während die FJAT-PGA-Variante A1+B2 ein schlechteres Kristallisationsverhalten als die Wildtyp FJAT-PGA zeigte. Möglicherweise führte der Austausch der Aminosäuren aus Cluster B1 zur veränderten Anordnung der PGA-Heterodimere im Kristallgitter und somit zur besseren Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2. Zur weiteren Analyse wurden auch hier die Kristallkontakte in der Wildtyp FJAT-PGA sowie der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 betrachtet. Bei beiden Varianten konnte ein Kristallkontakt mit Aminosäuren aus Cluster B1 ermittelt werden. Allerdings interagieren die Aminosäuren β E136 und K137 der FJAT-PGA mit anderen Aminosäuren als β A135 bis A137 in der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2.

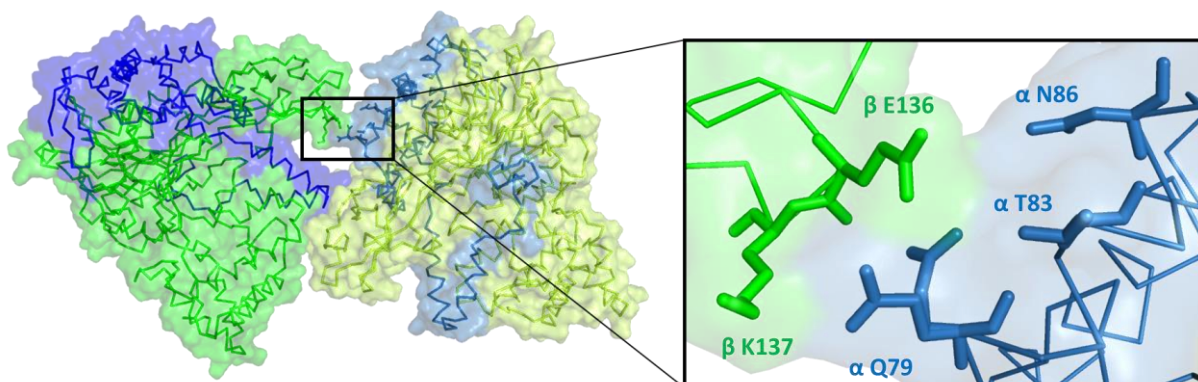


Abbildung 57: Darstellung des Kristallkontaktes zwischen dem nicht veränderten Cluster B1 (E136, K137) der β -Untereinheit (grün) der FJAT-PGA mit einer symmetrieverwandten α -Untereinheit FJAT-PGA (hellblau). Die α -Untereinheiten sind in blau bzw. hellblau dargestellt und die β -Untereinheiten in grün bzw. hellgrün.

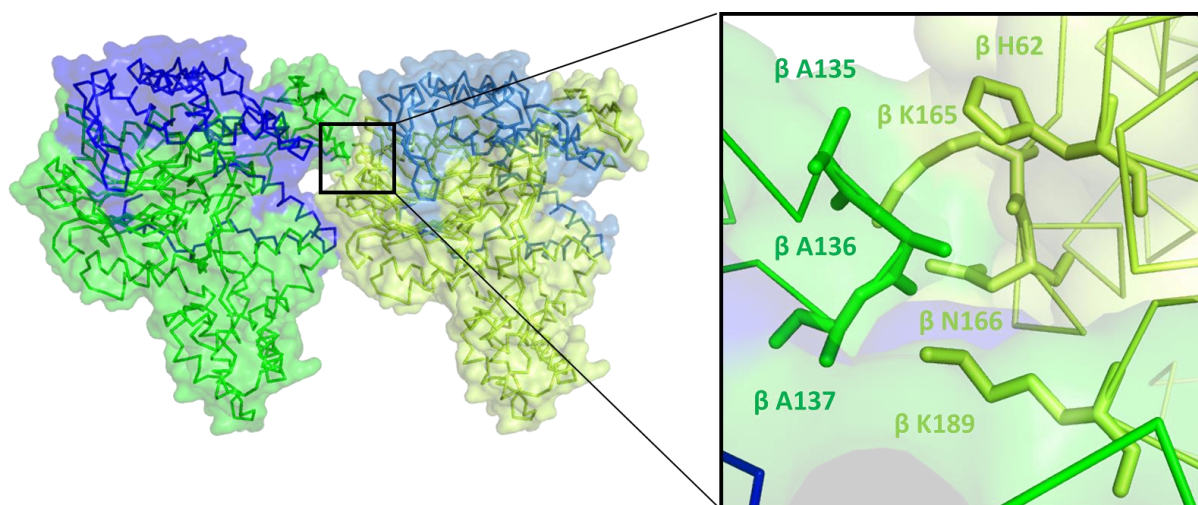


Abbildung 58: Darstellung des Kristallkontaktes zwischen dem veränderten Cluster B1 (A135-137) der β -Untereinheit (grün) der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 mit einer symmetrieverwandten β -Untereinheit FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 (hellgrün). Die α -Untereinheiten sind in blau bzw. hellblau dargestellt und die β -Untereinheiten in grün bzw. hellgrün.

Während β E136 und K137 der FJAT-PGA mit Q79, T83 und N86 einer α -Untereinheit eines anderen Heterodimers interagieren (Abbildung 57), interagieren bei der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 β A135, A136 und A137 mit H62, K165, N166 und K189 einer weiteren β -Untereinheit (Abbildung 58). Deshalb oder dadurch sind auch die Heterodimere der FJAT-PGA-Varianten anders zueinander positioniert. Weiterhin fällt auf, dass die Abstände beim Kontakt der FJAT-PGA mit einem minimalen Abstand von 3 Å größer sind als bei der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 mit minimal etwa 2 Å. Durch die kleinere Seitenkette der Alanine liegen bei der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 die Hauptketten auch deutlich näher zusammen als beim Wildtyp. Dadurch ist der Kontakt in der Variante vermutlich stabiler. Durch die reduzierte Flexibilität der Seitenkette muss zur Bildung dieses Kontaktes außerdem eine geringere entropische Barriere überwunden werden, sodass sich der Kontakt durch einen kleineren notwendigen Energieaufwand wahrscheinlich schneller bilden kann. Die Ausbildung dieses Kontaktes trägt damit vermutlich maßgeblich zur besseren Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 bei.

In der Wildtyp FJAT-PGA lagen die Aminosäuren des dritten Clusters B2 nicht in der Nähe eines anderen Heterodimers und waren somit an keinem Kristallkontakt beteiligt. Bei der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 konnte hingegen an der Aminosäure β A404 des Clusters B2 eine räumliche Nähe zu einigen Aminosäureresten einer symmetrieverwandten α -Untereinheit festgestellt werden, die hier einen weiteren Kristallkontakt bildeten (Abbildung 59). Durch diese zusätzliche Stabilisierung des Kristallgitters der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 kommt es wahrscheinlich auch zu einer weiteren Verbesserung der Kristallisierbarkeit.

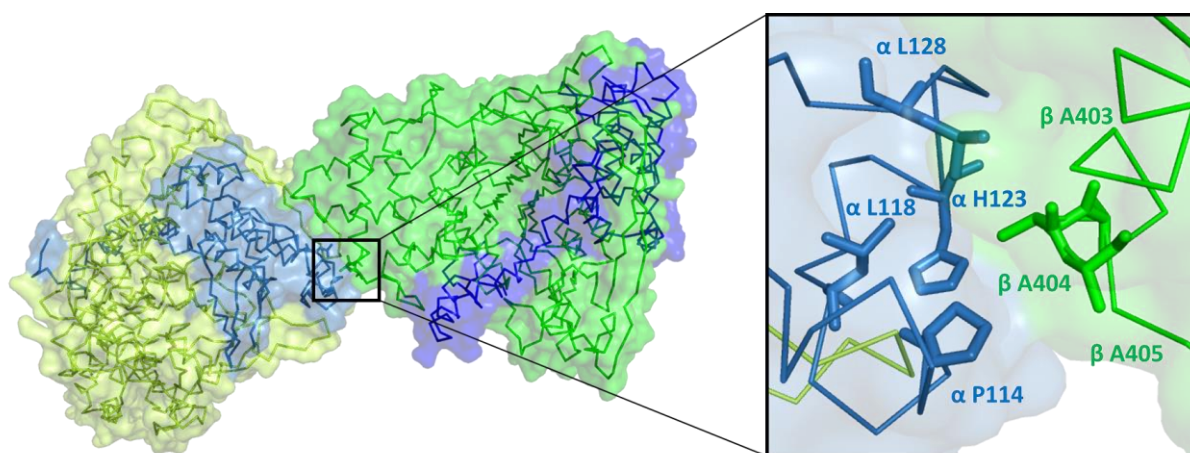


Abbildung 59: Darstellung des Kristallkontaktes zwischen dem veränderten Cluster B2 (A403-405) der β -Untereinheit (grün) der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 mit einer symmetrieverwandten α -Untereinheit FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2 (hellblau). Die α -Untereinheiten sind in blau bzw. hellblau dargestellt und die β -Untereinheiten in grün bzw. hellgrün.

Die Methode der Reduktion der Oberflächenentropie wurde ursprünglich zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit von schlecht kristallisierenden Proteinen und zur Verbesserung der Kristalle für eine höhere Auflösung durch Röntgenstrukturanalyse entwickelt (Derewenda 2004). Die Reduktion der Oberflächenentropie kann, wie hier gezeigt, aber auch für die Verbesserung bereits kristallisierender Proteine genutzt werden, um eine größere Menge an Kristallen in kürzerer Zeit zu gewinnen. Dies könnte eine Anwendung quervernetzter Enzymkristalle als immobilisierte Biokatalysatoren oder die Nutzung der Kristallisation als Reinigungsmethode ermöglichen.

Für andere Proteine wie beispielsweise für eine Alkoholdehydrogenase konnten ebenfalls durch Reduktion der Oberflächenentropie besser kristallisierende Varianten gefunden werden und diese aus *E. coli* Zelllysats mittels Fällungskristallisation gereinigt werden (Nowotny et al. 2019; Grob et al. 2020). Dies soll zukünftig auch für die besser kristallisierende FJAT-PGA-Variante getestet werden. Durch die Produktion mit *B. megaterium* ergibt sich zusätzlich der Vorteil gegenüber *E. coli*, dass statt Zelllysats direkt der konzentrierte Überstand zur Reinigung durch Kristallisation genutzt werden könnte, der im Vergleich weniger zusätzliche Proteine enthält.

4.8 Untersuchungen zur Verbesserung der Sekretion von Penicillin G Acylasen

Zusätzlich zur Optimierung der Eigenschaften des Enzyms sollte auch dessen Sekretion mit *B. megaterium* verbessert werden, um möglichst große Mengen rekombinanter, gegebenenfalls neuartiger PGAs bereitstellen zu können. Die Sekretion von rekombinanten Proteinen bietet im Gegensatz zu einer intrazellulären Ansammlung wie z. B. in *E. coli* Vorteile wie eine vereinfachte Produktgewinnung oder die Möglichkeit einer kontinuierlichen Kultivierung ohne Zellaufschluss (Biedendieck et al. 2011). Hierzu ist das Bodenbakterium *B. megaterium* von industrieller Relevanz, weil es rekombinante Proteine direkt in das umgebende Medium sekretiert, eine hohe natürliche Produktionskapazität hat und viele Produkte wie Vitamin B₁₂, Amylase oder Aminosäuren liefern kann (Korneli et al. 2013).

Zur Sekretion müssen Proteine ein N-terminales Signalpeptid tragen, das für die Translokation verantwortlich ist. Die Menge des sekretierten Proteins hängt von der Kombination aus Signalpeptid und Protein ab und lässt sich nicht bioinformatisch vorhersagen, sodass für jedes Protein individuell ein optimales Signalpeptid gefunden werden muss (Freudl 2018). In dieser Arbeit wurden drei Methoden zur Optimierung der Sekretion von PGAs getestet. Zunächst wurden einzelne Gene von Signalpeptiden aus *B. subtilis* und *B. megaterium* vor das *ffatpga*-Gen ohne Sequenz für das native Signalpeptid kloniert und die Proteinsekretion in *B. subtilis* und *B. megaterium* getestet. Weiterhin wurden drei Aminosäuren im nativen FJAT-PGA-Signalpeptid durch Sättigungsmutagenese verändert und mithilfe eines Screenings die Sekretion untersucht. Als drittes wurde versucht die Sekretion von PGAs mithilfe einer plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek mit Signalpeptiden aus *B. megaterium* zu verbessern. Die praktische Durchführung fand in Zusammenarbeit mit Studierenden statt (Müller 2018; Bischoff 2019; Menke 2020).

4.8.1 Sekretion von Penicillin G Acylase mit *B. megaterium* und *B. subtilis* über verschiedene Signalpeptide aus *Bacillus* species

Zunächst sollten zur Verbesserung der Sekretion der FJAT-PGA einzelne alternative Signalpeptide getestet werden. Dazu wurden das Signalpeptid der extrazellulären Lipase LipA (LipA-SP) aus *B. megaterium* und die Signalpeptide der Protease Epr (Epr-SP) und des Phosphatase-Regulators PhrK (PhrK-SP) aus *B. subtilis* ausgewählt. Das LipA-SP hat bereits bei der BmPGA und anderen rekombinanten Proteinen zu guten Sekretionserfolgen in *B. megaterium* geführt (Malten et al. 2006; Yang et al. 2006). PhrK-SP und Epr-SP aus *B. subtilis* wurden gewählt, da auch eine Produktion der FJAT-

PGA in *B. subtilis* WB800N getestet werden sollte. *B. subtilis* WB800N eignet sich für die heterologe Proteinproduktion, da dieser defizient bezüglich sieben extrazellulärer und einer Zellwand-assoziierten Protease ist (Wu et al. 2002; Nguyen et al. 2011). Das Epr-SP erzielte bei einem Test aller 173 *B. subtilis* Signalpeptide die beste Sekretion des gewählten Modellenzyms Cutinase und auch das PhrK-SP lag bei der Sekretion an Position 15 von 173 (Brockmeier et al. 2006). Es war mit 19 Aminosäuren zusätzlich ein sehr kurzes Signalpeptid, dessen korrespondierende Sequenz sich somit als Überhang des Primers während der PCR einfügen ließ. Als Vergleich diente die Sekretion über das native Signalpeptid aus *B. sp.* FJAT-27231. Nach der erfolgreichen Konstruktion der drei neuen Plasmide und Transformation von *B. megaterium* und *B. subtilis*, wurden die Plasmidstämme kultiviert und zur Produktion der FJAT-PGA mit Xylose induziert, um die Auswirkungen der verschiedenen Signalpeptide auf den Sekretionserfolg in zwei unterschiedlichen *Bacillus* Arten zu untersuchen. Zur Quantifizierung des Sekretionserfolges wurde die Enzymaktivität im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 60).

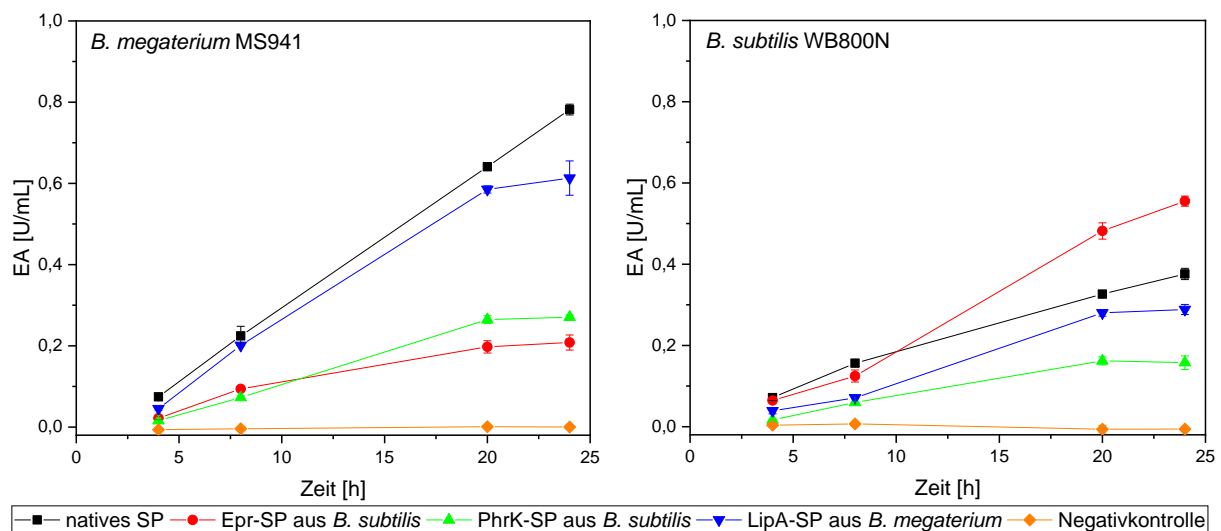


Abbildung 60: Volumetrische Enzymaktivität (EA) im zellfreien Kulturüberstand bei der Sekretion der FJAT-PGA mit verschiedenen Signalpeptiden mit *B. megaterium* MS941 und *B. subtilis* WB800N. Die Enzymaktivität wurde mittels NIPAB-Assay bestimmt. Als Negativkontrolle wurde der Vektor p3STOP1623hp ohne *pga*-Gen verwendet (modifiziert nach (Müller 2018)).

Bei der Negativkontrolle zeigte sich erwartungsgemäß keine PGA-Aktivität. Insgesamt nahm die volumetrische FJAT-PGA-Aktivität in beiden Stämmen unter Nutzung der verschiedenen Signalpeptide über die Kultivierungszeit zu. Bei der Produktion in *B. megaterium* konnten die höchsten Aktivitäten, die hier zur Beschreibung der Menge an sekretiertem Protein genutzt wurden, für das native Signalpeptid aus *B. sp.* FJAT-27231 erreicht werden. Nur leicht geringer war die Aktivität bei der Translokation über das LipA-SP, während die beiden Signalpeptide aus *B. subtilis* in *B. megaterium* zwar ebenfalls eine Sekretion bewirkten, allerdings die Aktivität verglichen mit der Sekretion mit dem nativen Signalpeptid nur etwa 25 % betrug. Bei der rekombinanten Proteinproduktion und Sekretion in *B. subtilis* WB800N führte das Epr-SP zur besten Sekretion der getesteten Signalpeptide, gefolgt vom nativen Signalpeptid, LipA-SP und PhrK-SP. Auffällig war, dass das Epr-SP in *B. subtilis* zum besten Sekretionserfolg unter den vier getesteten Signalpeptiden geführt hat und in *B. megaterium* zum schlechtesten. Interessant war auch, dass in *B. subtilis* im Gegensatz zu *B. megaterium* ein Signalpeptid

aus *B. subtilis* zur besten Sekretion geführt hat. Möglicherweise könnte eine weitere Steigerung durch Testen aller Signalpeptide aus *B. subtilis* erreicht werden. Das native Signalpeptid hat in beiden Organismen zu einer guten Sekretion geführt. Außerdem haben die Signalpeptide aus *B. subtilis* in *B. megaterium* zu einer Sekretion geführt und umgekehrt, sodass Signalpeptide aus *Bacillus* spp. auch in anderen *Bacillus* spp. gut zu funktionieren scheinen. Insgesamt bestätigte sich, dass für jedes Protein und für jeden Produktionsorganismus individuell das optimale Signalpeptid gesucht werden muss (Freudl 2018). Auch bei der Untersuchung von Brockmeier et al. (2006) mit allen Signalpeptiden aus *B. subtilis* hatte sich bereits gezeigt, dass das beste Signalpeptid für das Enzym Cutinase, eine eher schlechte Sekretion bei einer ebenfalls getesteten Esterase bewirkte. Zum Auffinden des optimalen Signalpeptids müsste eine große Anzahl von Signalpeptiden getestet werden, was in Kapitel 4.8.3 weiterführend untersucht wurde.

Obwohl die hier gemessene Enzymaktivität nach 24 h bei der Sekretion mit *B. subtilis* etwa 25 % geringer war als bei *B. megaterium* (Abbildung 60), möglicherweise aufgrund eines noch nicht optimalen Signalpeptids, ist aus der Literatur bekannt, dass mit *B. subtilis* sehr hohe Produktivitäten und Produkttiter erreicht werden können (Lakowitz et al. 2018). Deshalb sollte nun getestet werden, ob sich die PGA aus *B. subtilis* reinigen ließ und dabei zukünftig größere Ausbeuten als bei *B. megaterium* erreichbar wären. Die Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie erwies sich allerdings als problematisch, da sich im zellfreien Überstand von *B. subtilis* sehr viele wirtseigene Proteine befanden, die die Säule mit der Zeit blockiert haben. Diese große Anzahl an Proteinen wurde auch anhand einer Ammoniumsulfatfällung der Proteine aus dem Überstand deutlich (Abbildung 61).

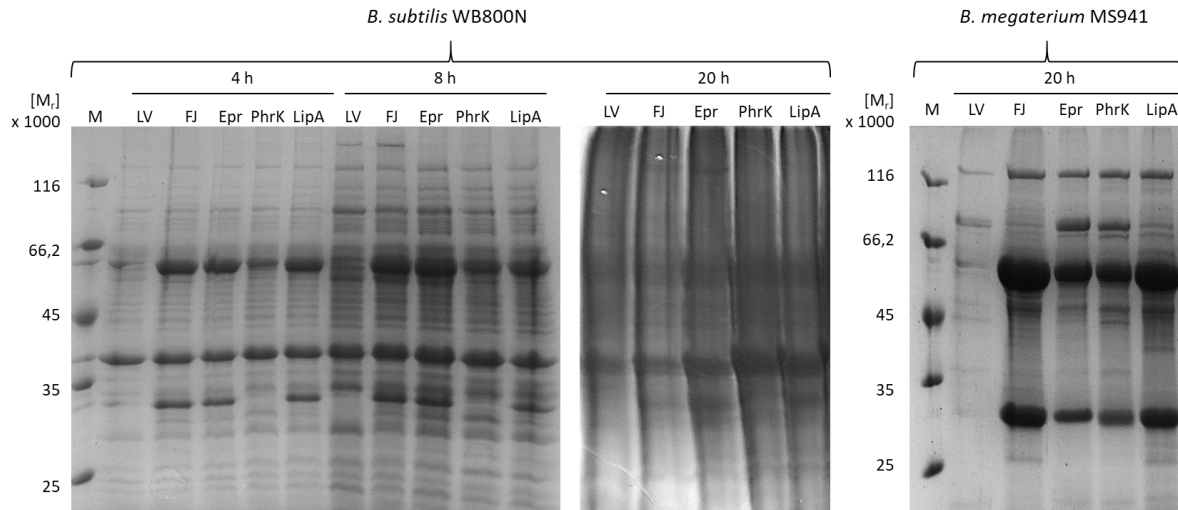


Abbildung 61: SDS-PAGE zur Analyse von FJAT-PGA und weiteren von *B. subtilis* WB800N bzw. *B. megaterium* MS941 sekretierten Proteinen. Nach 4, 8 und 20 h Kultivierung von *B. subtilis* WB800N bzw. 20 h von *B. megaterium* MS941 mit einem Leervektor (LV) und Plasmiden zur Produktion der FJAT-PGA mit nativem Signalpeptid (FJ), Epr-SP, PhrK-SP und LipA-SP bei 37 °C und 220 rpm wurden die extrazellulären Proteine mittels Ammoniumsulfat aus 1,5 mL zellfreiem Überstand gefällt. Neben den gefällten extrazellulären Proteinen wurde ein Proteinstandard (M) aufgetragen. Modifiziert nach Müller (2018).

Bereits nach 4-stündiger Kultivierung waren deutliche Proteinbanden im Bereich der α - und β -Untereinheiten der PGA zu erkennen. Weiterhin war noch ein weiteres Protein bei einer relativen molaren Masse von etwa 38.000 in großer Konzentration neben weiteren Proteinen erkennbar. Im weiteren Verlauf der Kultivierung lagen sehr viele weitere Proteine in großer Menge im Überstand vor,

sodass die PGA-Untereinheiten kaum noch das Exoproteom dominierten. Im Vergleich dazu lag die FJAT-PGA bei einer Produktion und Sekretion mit *B. megaterium* fast rein im Überstand vor (Abbildung 61). Dieser Vergleich verdeutlicht, dass rekombinante Proteine durch Produktion und Sekretion mit *B. megaterium* sehr rein vorliegen und damit eine Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie ermöglicht werden kann. Dadurch können rekombinante Proteine ohne zusätzliche Protein-Tags erhalten werden. Weiterhin könnte, wie in Kapitel 4.7 diskutiert, versucht werden PGAs durch Kristallisation direkt aus dem Überstand zu gewinnen.

4.8.2 Untersuchung der Sekretion der FJAT-PGA nach Sättigungsmutagenese im Signalpeptid

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Sekretion war die Veränderung des nativen Signalpeptids an drei ausgewählten Positionen, statt des Austausches des gesamten Signalpeptids. Dazu wurde die semirationale Methode der Sättigungsmutagenese angewendet. Hierbei werden in einer zuvor ausgewählten Region einzelne oder mehrere Codons verändert, um fokussierte Bibliotheken zu erhalten. Das entsprechende Codon kann mithilfe eines Primermixes (NNN) durch alle 64 möglichen Codons ersetzt werden, sodass alle 20 Aminosäuren erhalten werden können. Weiterhin können degenerierte NNS- oder NNK-Codons eingesetzt werden (N = beliebige Base, S = G oder C, K = T oder G). Dabei können immer noch alle Aminosäuren codiert werden, aber die Wahrscheinlichkeit für ein Stopcodon verringert sich und die häufigsten Codonvarianten sind weniger stark überrepräsentiert (Patrick and Firth 2005; Kille et al. 2013). In diesem Experiment wurden NNS-Primer eingesetzt, um den korrespondierenden Bereich des FJAT-PGA-Signalpeptids zu verändern. Es wurde bereits früher gezeigt, dass die Veränderung der positiv geladenen N-Domäne von Signalpeptiden in *B. subtilis* einen Einfluss auf die Sekretion hat, da diese vermutlich mit dem Motorprotein SecA und dem Signal recognition particle interagiert (Chen and Nagarajan 1994; Caspers et al. 2010). Dazu wurden beispielsweise die Aminosäuren von Position zwei bis sieben eines Signalpeptids einzeln durch Sättigungsmutagenese verändert, was zu einer bis zu dreifach erhöhten Sekretionseffizienz von Cutinase in *B. subtilis* führte (Caspers et al. 2010). Auch für das FJAT-PGA-Signalpeptid sollte nun ein Austausch einiger Aminosäuren aus der positiv geladenen N-Domäne durchgeführt werden. An Position zwei im FJAT-PGA-Signalpeptid befindet sich ein positiv geladenes Lysin. Dieses ist in den oben untersuchten Signalpeptiden Epr-SP, PhrK-SP und LipA-SP sowie in dem der BtPGA und BmPGA konserviert, weshalb diese Position nicht für die Mutagenese verwendet wurde. Stattdessen wurden die beiden folgenden nicht konservierten Lysine K3 und K4 sowie Tryptophan W5 mittels Sättigungsmutagenese mit NNS-Primern unter Nutzung des QuikChange™-Mutageneseverfahrens verändert. Zunächst wurde *E. coli* mit den erhaltenen Plasmiden transformiert, um eine ausreichende Menge an veränderten Plasmiden zu generieren, da die Transformationseffizienz von *B. megaterium* deutlich schlechter als die von *E. coli* ist (Vary et al. 2007). Anschließend wurde die Plasmid-DNA jeweils als Gemisch gereinigt und *B. megaterium* MS941 mit dem Plasmidmix transformiert. Es wurden jeweils Einzelklone im BioLector® kultiviert und die PGA-Aktivität im zellfreien Kulturüberstand mittels NIPAB-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde die FJAT-PGA mit nativem Signalpeptid verwendet und als Negativkontrolle wurde ein MS941-Stamm mit einem Vektor ohne *pga*-Gen (p3STOP1623hp)

eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde als indirektes Maß für die Menge an sekretiertem Protein gewertet.

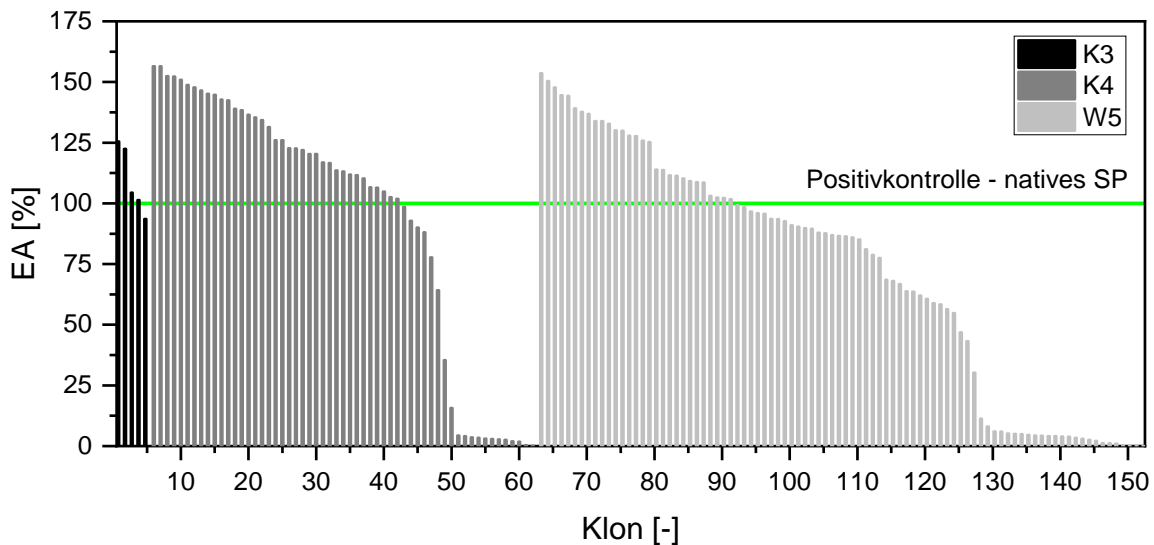


Abbildung 62: Enzymaktivität (EA) im zellfreien Kulturüberstand nach Sättigungsmutagenese im Signalpeptid der FJAT-PGA an der Position K3, K4 oder W5 in % zur Positivkontrolle (natives Signalpeptid). *B. megaterium* wurde mit einem Plasmidmix transformiert und Einzelkolonien genutzt, um Vorkulturen anzupflanzen. Die Kultivierung fand in 48-Well Flowerplates im Mikrobioreaktor statt. Es wurden 1,2 mL LB-Medium mit Tetracyclin, CaCl₂ und Xylose im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und für 24 h bei 37 °C und 1200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität mittels NIPAB-Assay im zellfreien Überstand bestimmt (Müller 2018).

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Enzymaktivitäten aller getesteten Klone bezogen auf die Sekretion mit dem nativen Signalpeptid dargestellt und pro Position von der höchsten zur niedrigsten Enzymaktivität sortiert (Abbildung 62). Für den Aminosäureaustausch an Position K3 konnten aufgrund der schlechten Transformationseffizienz nur fünf *B. megaterium* Klone getestet werden. Diese zeigten zwar alle eine dem nativen Signalpeptid ähnliche Aktivität, allerdings kann aus fünf Kultivierungen keine Aussage über den Einfluss dieses Aminosäurerestes auf die Sekretion getroffen werden.

Bei der Sättigungsmutagenese an Position K4 im FJAT-Signalpeptid konnte bei 67 % der 57 untersuchten Klone eine um 2 - 56 % höhere Aktivität als bei Verwendung des nativen, unveränderten Signalpeptids beobachtet werden. Bei 21 % der Klone wurde fast keine Aktivität gemessen.

Bei durch Sättigungsmutagenese an Position W5 entstandenen Klonen wiesen 32 % der getesteten 90 Varianten eine um 2 - 54 % höhere Aktivität als der Wildtyp auf, bei 27 % wurde die FJAT-PGA kaum sekretiert.

Die große Anzahl an kaum aktiven Klonen, trotz nur jeweils einer veränderten Aminosäure, könnte zum einen durch den Einbau eines Stopcodons erfolgt sein und zum anderen durch den Einbau einer Aminosäure, die die positive Ladung der n-Region verändert und das Signalpeptid dadurch nicht mehr mit dem Translokationsapparat interagieren kann (Wang et al. 2014; Freudl 2018). Sowohl bei der Veränderung von K4 als auch W5 zeigte der im Screening beste Klon eine um 50 % erhöhte Sekretion verglichen mit dem nativen Signalpeptid.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der erhöhten Sekretion wurden die besten Klone des Screenings erneut in größerem Volumen im Schüttelkolben kultiviert und die Enzymaktivitäten im Überstand mittels NIPAB-Assay bestimmt. Weiterhin wurde mittels DNA-Sequenzierung identifiziert, welcher Aminosäurerest eingesetzt wurde.

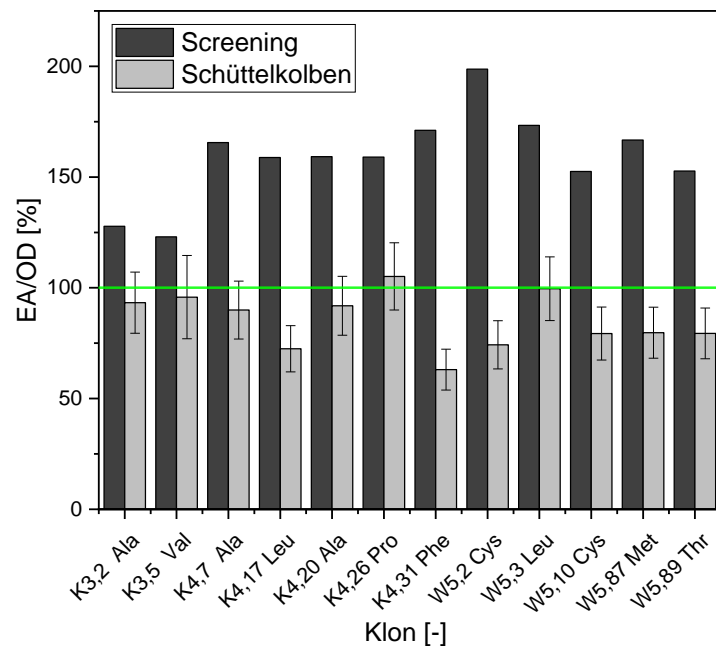


Abbildung 63: Vergleich der Enzymaktivitäten im Überstand im Screening (schwarz) und im Wiederholungsansatz im Schüttelkolben (grau) von FJAT-PGA, die mit Signalpeptid mit Punktmutationen an Position K3, K4 bzw. W5 sekretiert wurde. Die Enzymaktivitäten wurden auf die optische Dichte normiert und in Bezug auf die Aktivität der FJAT-PGA mit ihrem nativen Signalpeptid (100 %, grüne Linie) bezogen. Zur Abschätzung der Biomasse wurde im Screening eine Streulichtmessung bei 620 nm durchgeführt und im Schüttelkolben-Maßstab die OD₅₇₈ bestimmt. Durch Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierung wurden die entsprechenden veränderten Aminosäuren bestimmt.

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen Screening und Reproduktion wurden die Aktivitätswerte auf die gebildete Biomasse normiert und wiederum jeweils die Aktivität nach Sekretion mit dem nativen Signalpeptid als 100 % gesetzt (Abbildung 63). Dabei zeigte sich, dass die Enzymaktivität bzw. Sekretion bei allen ausgewählten Varianten im Schüttelkolben in etwa der des nativen Signalpeptids entsprach oder sogar geringer war. Es konnte somit keine im Screening detektierte erhöhte Sekretion im größeren Maßstab bestätigt werden. Wahrscheinlich müsste die Screening-Methode angepasst und verbessert werden. Die Kulturen waren sehr unterschiedlich stark gewachsen, wodurch die Aktivität im Überstand variierte und die Unterschiede durch die Aminosäureaustausche überdeckte. Zur Verbesserung müsste beispielsweise die optische Dichte aller Vorkulturen gemessen und entsprechend auf eine bestimmte OD inokuliert werden.

Da alle Klone der Reproduktion eine sehr ähnliche Aktivität zum Wildtyp zeigten, kann trotz der Ungenauigkeiten in der Screeningmethode vermutet werden, dass die gewählten Aminosäurepositionen der n-Region möglicherweise keinen oder kaum Einfluss auf die Sekretion der FJAT-PGA hatten oder zu wenig Klone getestet wurden. Um statistisch mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit eine vollständige Abdeckung bei einer über NNS- oder NNK-Primer veränderten Position zu erreichen, müssten 172 Klone untersucht werden (Nov 2012). Bei den Versuchen von Caspers et al. (2010) wurde mit 200 untersuchten Klonen eine ähnliche Größenordnung gewählt. Hier führten Aminosäureaustausche durch Sättigungsmutagenese im *B. subtilis* Signalpeptid der α -Amylase E an den Positionen 2 bis 7 zu einer bis zu 3-fach erhöhten Sekretion der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* mit *B. subtilis*. Allerdings wurde dort mit dem Signalpeptid der α -Amylase E ein Signalpeptid gewählt, welches vor der Veränderung nur eine mittelmäßige Sekretion zeigte, sodass noch

Verbesserungspotential vorhanden war (Caspers et al. 2010). Möglicherweise war die Translokationseffizienz des FJAT-PGA-Signalpeptids bereits gut und konnte deshalb kaum verbessert werden. Da keine erhöhte Sekretion aus dem Screening im größeren Maßstab wiederholt werden konnte, bestätigte die Identifikation der Aminosäuren an den Positionen 3, 4 und 5 des Signalpeptids nur, dass die Sättigungsmutagenese funktioniert hat, da verschiedene Aminosäuren nachgewiesen werden konnten.

Insgesamt schien der Ansatz, ganze Signalpeptide auszutauschen, vielversprechender zu sein als die Änderung einzelner Aminosäuren. Deshalb wurde im Folgenden ein neues Verfahren zum Testen einer Signalpeptid-Bibliothek zur Verbesserung der Sekretion unter optimierten Versuchsbedingungen angewendet.

4.8.3 Verbesserung der PGA-Sekretion durch Screening einer Signalpeptid-Bibliothek

Die Menge eines sekretierten Proteins hängt von der Kombination aus Signalpeptid und Protein ab. Allerdings ist eine bioinformatische Vorhersage zur Effizienz bisher nicht möglich (Freudl 2018). Daher ist die Entwicklung eines einfachen und schnellen Klonierungs- und Screening-Systems notwendig, um das beste Signalpeptid für ein bestimmtes, rekombinantes Protein zu identifizieren.

Da alle in dieser Arbeit identifizierten PGAs aus *Bacillus* spp. stammten und laut Vorhersage über SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011) über den Sec-Weg sekretiert werden, waren die nativen Signalpeptide mit dem Sekretionsapparat von *B. megaterium* kompatibel, sodass alle neuartigen PGAs sekretiert werden konnten (Kapitel 4.1). Allerdings waren die sekretierten Proteinmengen im Überstand deutlich unterschiedlich (Abbildung 16). Während bei FJAT- und BtPGA starke Proteinbanden für α - und β -Untereinheit sichtbar waren, waren von der Bn-, UNC- und BmasPGA nur sehr schwache Banden erkennbar. Dies resultierte in einer Aktivität von 2, 5 und 8 % bezogen auf die BmPGA-Aktivität und zeigte so, dass die Enzyme aktiv waren (Abbildung 17). Um zu überprüfen, ob die PGAs nur schlecht produziert (Transkription, Translation) oder kaum sekretiert wurden, folgte die Analyse der intrazellulären Proteine. Bei Analyse der löslichen intrazellulären Proteine konnten keine Unterschiede im Vergleich zu den löslichen Proteinen einer Negativkontrolle, die einen Vektor ohne *pga*-Gen enthielt, festgestellt werden (Abbildung 64). Bei der Analyse der unlöslichen Proteine waren bei allen PGA-Produktionen Proteinbanden bei einem relativen Molekulargewicht von 80.000 bis 90.000 sichtbar, welche in der Negativkontrolle nicht erkennbar waren. Beim Export über den Sec-Weg werden die PGAs zunächst als Präproprotein mit Signalpeptid, α -Untereinheit, Linker und β -Untereinheit produziert. Nach der Translokation werden Signalpeptid und Linker abgespalten sowie das Protein in seine aktive Konformation gefaltet. Bei diesen sichtbaren Banden von 80 bis 90 kDa könnte es sich folglich um die Präproproteine der verschiedenen PGAs handeln. Diese lagen unlöslich vor, weil sie noch nicht oder falsch gefaltet waren. Die PräproPGAs aus den verschiedenen Spezies zeigten ein etwas unterschiedliches Laufverhalten. Dies könnte an unterschiedlichen, nicht komplett durch SDS ausgeglichenen Ladungen oder an einem unterschiedlichen Entfaltungsgrad liegen. Alle PGAs lagen nach 3 h Kultivierung in ähnlichen Konzentrationen als unlösliche Proteine im Zellinneren vor. Wahrscheinlich wurden also alle PGAs in ähnlichen Mengen produziert, aber unterschiedlich gut sekretiert. Bei der FJAT-PGA schien die Menge an PräproPGA etwas geringer zu sein. Möglicherweise

wurde sie bereits stärker sekretiert oder die Produktion verlief zu Beginn etwas langsamer. 6 h nach Induktion zeigten sich ähnliche Mengen der PräproPGAs in den Zellen, wobei nur die Bande der PräproBmPGA kaum noch zu erkennen war. Möglicherweise lief die Sekretion hier effizienter, weil sowohl der Ursprung des Signalpeptids als auch der Produktionsstamm *B. megaterium* Stämme waren.

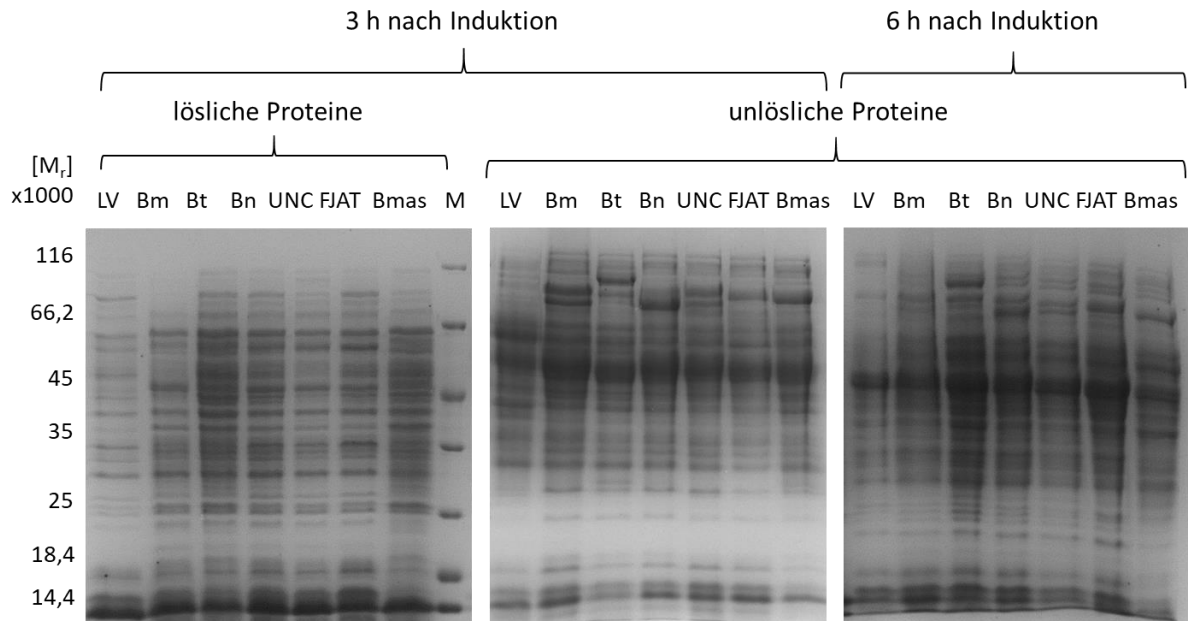


Abbildung 64: SDS-PAGE der intrazellulären Proteine bei der Produktion von rekombinanten PGAs mit *B. megaterium*. Nach 3 und 6 h Kultivierung (nach Induktion) von rekombinanten *B. megaterium* Stämmen mit den Plasmiden zur Produktion der PGAs aus *B. megaterium* (Bm), *B. thermotolerans* (Bt), *B. niacini* (Bn), *B. sp.* UNC438CL73TsuS30 (UNC), *B. sp.* FJAT-27231 (FJAT), *B. massiliogorillae* (Bmas) und einer Leervektorkontrolle (LV) bei 37 °C wurden die löslichen und unlöslichen extrazellulären Proteine mittels SDS-PAGE analysiert, modifiziert nach Bischoff (2019).

Zur Verbesserung der Sekretion der PGAs sollten nun verschiedene Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 getestet werden. Statt wie bisher alle korrespondierenden Gensequenzen der Signalpeptide getrennt per PCR zu amplifizieren und einzeln vor die Gene der entsprechenden PGAs zu klonieren, sollte ein System getestet werden, das auf einer plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek beruht, die von Tobias Knuuti für *B. megaterium* entwickelt wurde (Knuuti 2015; Baumgarten 2019). Dabei sollten alle in *B. megaterium* DSM319 vorkommenden Sec-Signalpeptide zur Verfügung stehen, um diese in Kombination mit einem zu sekretierenden, rekombinanten Protein wie einer neuartigen PGA testen zu können. Dazu wurden mithilfe des Tools SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011) alle 182 Sec-Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 identifiziert. Damit diese nicht einzeln durch PCR amplifiziert und kloniert werden müssen, wurden je 18 bis 20 Signalpeptide, jeweils flankiert von den Restriktionsschnittstellen BsrGI und NgoMIV, auf zehn sogenannten Multisignalpeptidplasmiden (pMSP1-10) angeordnet. Dabei wurden die Signalpeptide nach Größe geordnet. pMSP1 enthält die längsten und pMSP10 die kürzesten Signalpeptide. Durch Verwendung der pMSPs wird eine schnelle Amplifikation der Signalpeptide in *E. coli* und eine einfache Klonierung gewährleistet (Knuuti 2015; Baumgarten 2019). Dieses Testsystem sollte nun eingesetzt werden, um die Sekretion der BmasPGA zu verbessern und damit eine Reinigung und Charakterisierung dieser zu ermöglichen. Die BmasPGA wurde ausgewählt, da diese mit ihrem nativen Signalpeptid von *B. megaterium* nur in geringer Menge sekretiert wurde.

Allerdings zeigte diese mit 8 % verglichen mit der BmPGA-Aktivität zumindest die größte Aktivität der schlecht sekretierten PGAs (Abbildung 17).

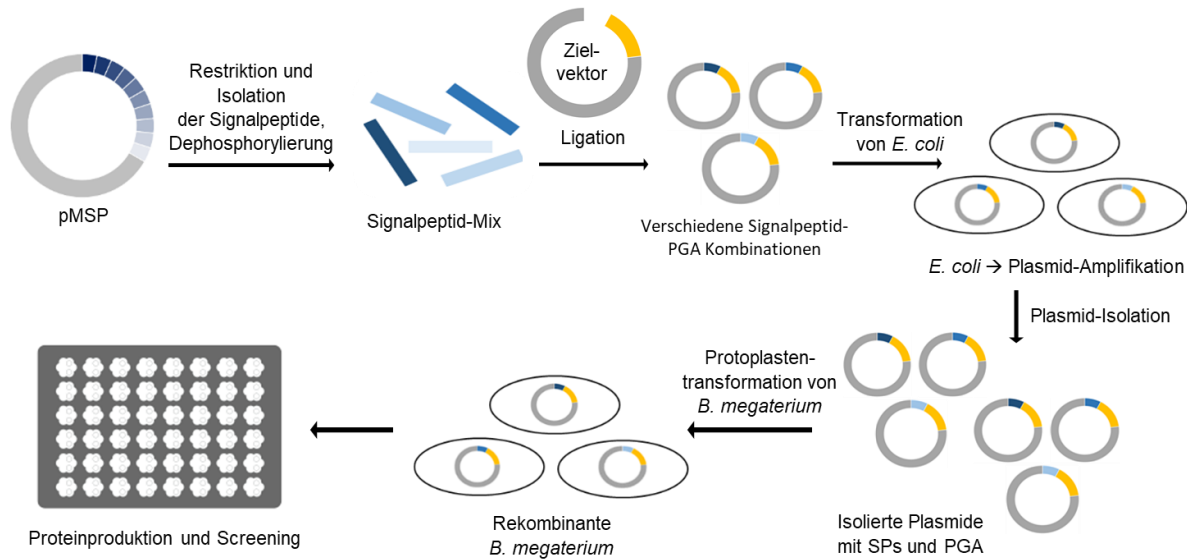


Abbildung 65: Darstellung von Klonierungsverfahren und Screening zur Identifikation von Signalpeptid-PGA-Kombinationen, die zu einer hohen Sekretion in *B. megaterium* führen. Signalpeptide sind in blau dargestellt und das Zielprotein (PGA) in gelb, modifiziert nach Baumgarten (2019).

Daher wurde zunächst ein Vektor mit dem *pga*-Gen aus *B. massiliogorillae* und den entsprechenden Schnittstellen zum Einfügen der Signalpeptide erstellt. Anschließend wurden jeweils alle Signalpeptide mit den beiden Restriktionsendonucleasen BsrGI und NgoMIV aus einem pMSP geschnitten (Abbildung 65). Der Signalpeptid-Ansatz wurde dephosphoryliert, um zu verhindern, dass mehrere Signalpeptide hintereinander in einen Vektor eingebaut werden (Baumgarten 2019). Nach Reinigung der Signalpeptide wurden diese als Mix zum Zielvektor mit *bmaspga*-Gen, der zuvor ebenfalls mit BsrGI und NgoMIV geschnitten wurde, gegeben. Durch Einbau je eines Signalpeptids ergab sich eine Mischung von Vektoren, die jeweils ein Signalpeptid und das entsprechende *pga*-Gen enthielten. Zur Vervielfältigung des Plasmidmixes wurde *E. coli* verwendet. Nach der Plasmidisolation aus bis zu 200 *E. coli*-Klonen wurde *B. megaterium* MS941 mit dem Plasmidmix transformiert. Um beim folgenden Screening jeweils nur eine Signalpeptid-Kombination testen zu können, mussten nach der Transformation Einzelkolonien entnommen und diese eingesetzt werden (Baumgarten 2019). Um aussagekräftigere Ergebnisse als im vorherigen Screening (Kapitel 4.8.2) zu erhalten, wurde die OD₅₇₈ aller Vorkulturen bestimmt und alle Hauptkulturen auf die gleiche Start-OD beimpft. Nach Kultivierung im Mikrobioreaktor wurde die PGA-Aktivität im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay bestimmt. Die gemessene PGA-Aktivität diente als indirektes Maß der sekretierten Proteinmenge.

Die Sekretion der BmasPGA wurde mit Signalpeptiden der pMSPs 3, 4 und 5 untersucht. Signalpeptide des pMSP3 führten bei einem ersten Test der plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek mit α -Amylase zu den besten Ergebnissen, weshalb diese auch mit der BmasPGA getestet wurden. Außerdem wurden Signalpeptide des pMSP4 und 5 zur Verbesserung der BmasPGA-Sekretion untersucht. Die entsprechenden Signalpeptide von pMSP4 führten ebenfalls zu einer guten Sekretion von α -Amylase, während die von pMSP5 zu einer schlechten Sekretion mit maximal 50 % der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle führten (Baumgarten 2019). Diese sollten nun mit einem anderen Protein getestet werden.

Beim Screening zeigte sich, dass die volumetrischen Enzymaktivitäten der BmasPGA im Überstand, die hier als Maß für die sekretierten BmasPGA-Mengen verwendet wurden, durch die Verwendung alternativer Signalpeptide aus *B. megaterium* DSM319 deutlich gesteigert werden konnten. Bei der Untersuchung der BmasPGA-Überstände von 94 Klonen mit Signalpeptiden des pMSP3 zeigten 91,5 % der untersuchten Klone eine höhere Aktivität als die im Überstand mit nativem Signalpeptid (Abbildung 66 und 67). Von den 46 BmasPGA-Klonen mit Signalpeptiden aus pMSP4 zeigten 85 % eine erhöhte Aktivität im Überstand und damit eine größere Menge an sekretierter BmasPGA als mit dem nativen Signalpeptid (Abbildung 68). Bei Nutzung von Signalpeptiden aus pMSP5 führten dahingegen nur 31 % der Klone zu einer höheren Aktivität im Überstand verglichen mit dem nativen Signalpeptid und 69 % zu nahezu keiner BmasPGA-Sekretion (Abbildung 69). Auch bei der α -Amylase führten Signalpeptide aus pMSP5 sogar bei allen getesteten Klonen zu einer geringeren Sekretion als bei dem als Positivkontrolle verwendeten β -Amylase-Signalpeptid (Baumgarten 2019). Insgesamt enthält pMSP5 etwas kürzere Signalpeptide als die pMSPs 3 und 4. Allerdings konnten bei der BmasPGA im Gegensatz zur α -Amylase trotz vieler Klone mit nicht funktionalen Signalpeptiden einige mit deutlich gesteigerter Enzymaktivität im Überstand (bis 15-fach höher, 0,22 U/mL) identifiziert werden. Die höchsten Enzymaktivitäten im Überstand konnten im Screening mit Signalpeptiden von pMSP3 und pMSP4 mit einer 29-fach bzw. 21-fach höheren Aktivität im Vergleich zur Sekretion mit dem natürlichen BmasPGA-Signalpeptid erhalten werden. Die erreichten volumetrischen Enzymaktivitäten von 0,43 bzw. 0,31 U/mL entsprachen etwa denen, die mit der BtPGA erreicht wurden (Abbildung 17), sodass eine Reinigung möglich sein sollte. Da im Screening allerdings nur kleine Volumina und eine Einfachbestimmung verwendet wurden, sollten die Aktivitäten der besten Klone zunächst bestätigt und reproduziert werden.

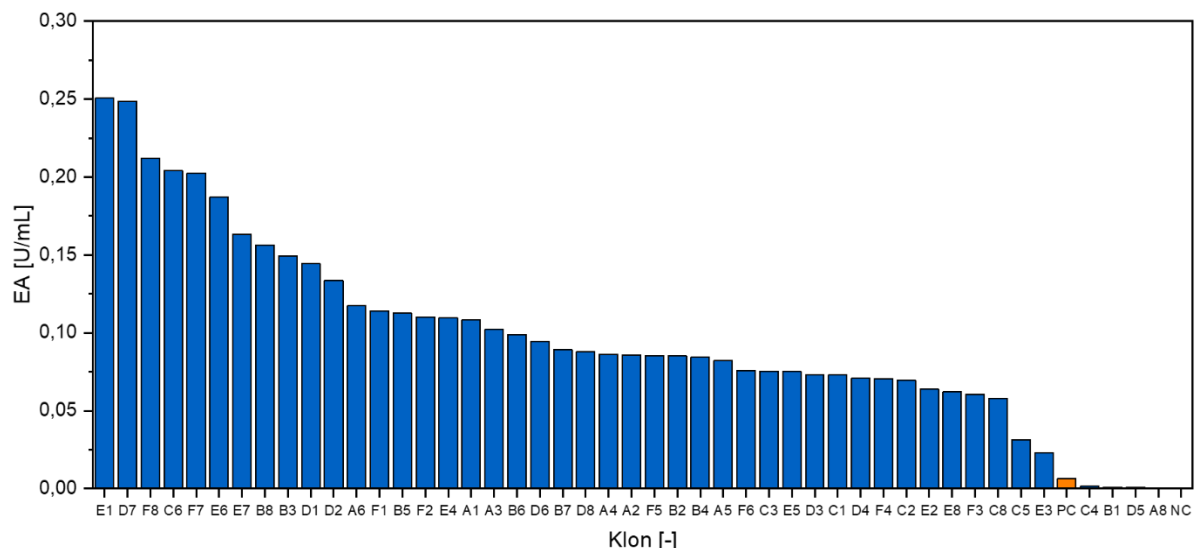


Abbildung 66: Volumetrische Enzymaktivität (EA) in Überständen mit BmasPGA, die mittels alternativer Signalpeptide aus dem pMSP3 mit *B. megaterium* MS941 sekretiert wurde (Screening pSMP3a). Die Kultivierung erfolgte im Mikrobioreaktor bei 37 °C und 1400 rpm für 22 h. Die Enzymaktivität wurde nach Zentrifugation im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay bei 37 °C bestimmt. Als Positivkontrolle (PC, orange) diente Überstand der BmasPGA mit nativem Signalpeptid und als Negativkontrolle (NC) *B. megaterium*-Überstand mit dem Leervektor p3STOP1623hp. Modifiziert nach Menke (2020).

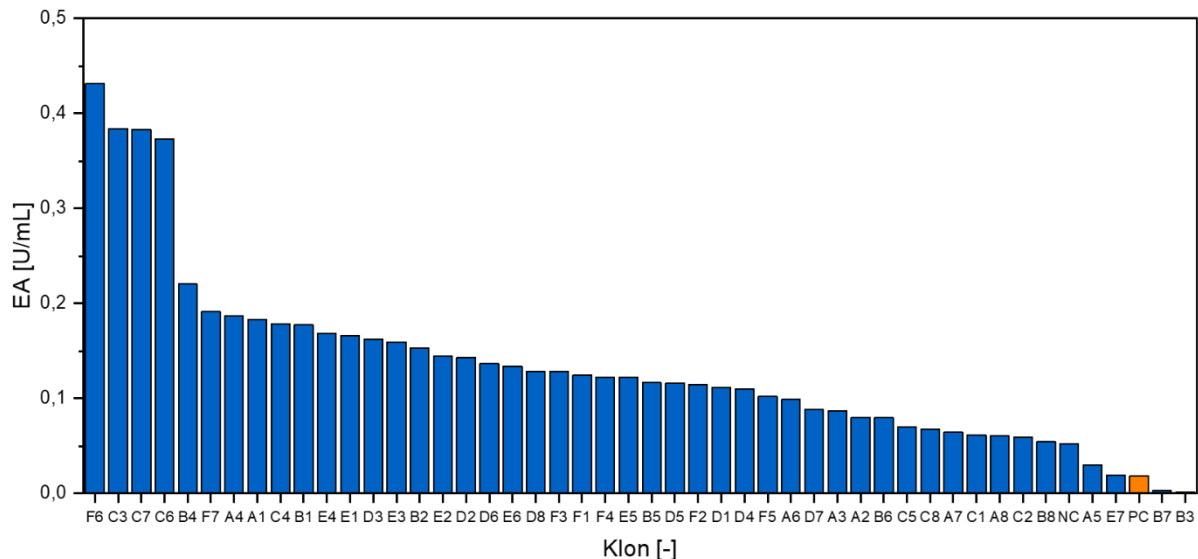


Abbildung 67: Volumetrische Enzymaktivität (EA) in Überständen mit BmasPGA, die mittels alternativer Signalpeptide aus dem pMSP3 mit *B. megaterium* MS941 sekretiert wurde (Screening pSMP3b). Die Kultivierung erfolgte im Mikrobioreaktor bei 37 °C und 1400 rpm für 22 h. Die Enzymaktivität wurde nach Zentrifugation im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay bei 37 °C bestimmt. Als Positivkontrolle (PC, orange) diente Überstand der BmasPGA mit nativem Signalpeptid und als Negativkontrolle (NC) *B. megaterium*-Überstand mit dem Leervektor p3STOP1623hp. Modifiziert nach Menke (2020).

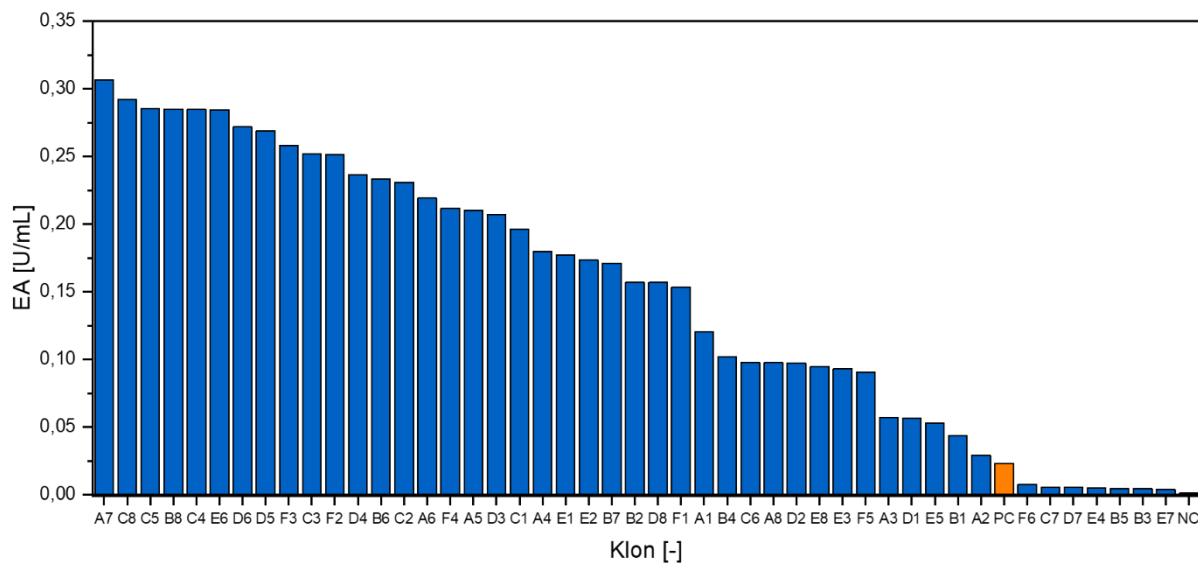


Abbildung 68: Volumetrische Enzymaktivität (EA) in Überständen mit BmasPGA, die mittels alternativer Signalpeptide aus dem pMSP4 mit *B. megaterium* MS941 sekretiert wurde. Die Kultivierung erfolgte im Mikrobioreaktor bei 37 °C und 1400 rpm für 22 h. Die Enzymaktivität wurde nach Zentrifugation im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay bei 37 °C bestimmt. Als Positivkontrolle (PC, orange) diente Überstand der BmasPGA mit nativem Signalpeptid und als Negativkontrolle (NC) *B. megaterium*-Überstand mit dem Leervektor p3STOP1623hp. Modifiziert nach Menke (2020).

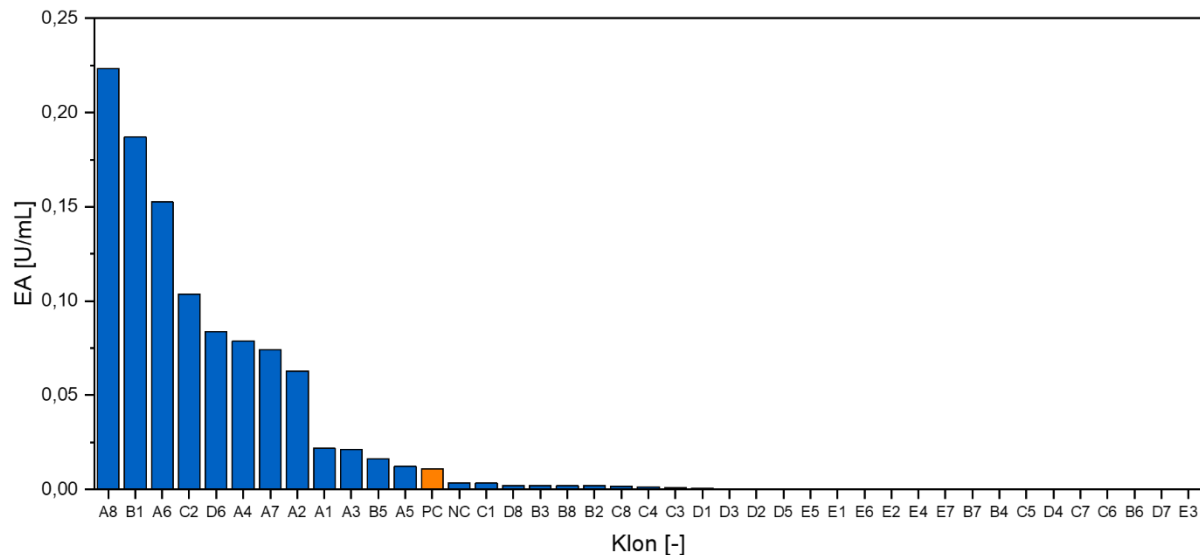


Abbildung 69: Volumetrische Enzymaktivität (EA) in Überständen mit BmasPGA, die mittels alternativer Signalpeptide aus dem pMSP5 mit *B. megaterium* MS941 sekretiert wurde. Die Kultivierung erfolgte im Mikrobioreaktor bei 37 °C und 1400 rpm für 22 h. Die Enzymaktivität wurde nach Zentrifugation im zellfreien Überstand mittels NIPAB-Assay bei 37 °C bestimmt. Als Positivkontrolle (PC, orange) diente Überstand der BmasPGA mit nativem Signalpeptid und als Negativkontrolle (NC) *B. megaterium*-Überstand mit dem Leervektor p3STOP1623hp. Modifiziert nach Menke (2020).

Zur Verifikation dieser vielversprechenden Screening-Ergebnisse wurden die BmasPGA-Klone, die jeweils zur höchsten Aktivität im Überstand und damit zur besten Sekretion geführt haben, im 50 mL-Maßstab im Schüttelkolben produziert und die Sekretion 22 h nach Induktion über Messung der Enzymaktivität abgeschätzt (Abbildung 70).

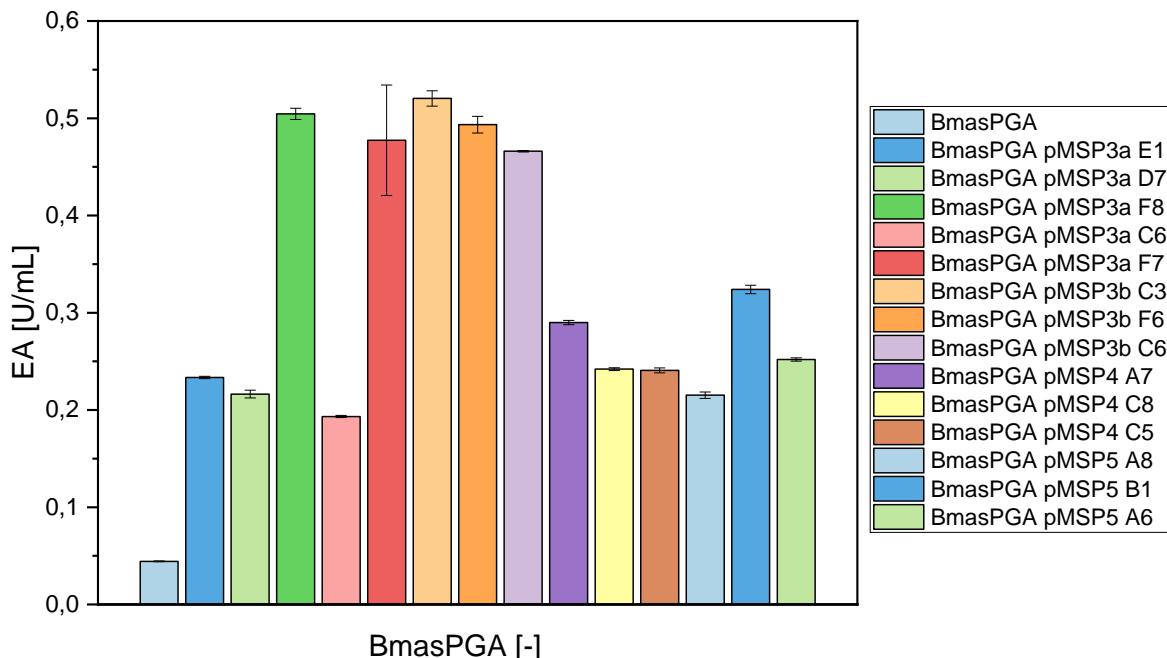


Abbildung 70: Volumetrische Enzymaktivität (EA) von ausgewählten BmasPGA-Klonen, die im Screening erhöhte Aktivitäten zeigten (Abbildungen 66 - 69). Die Klone mit alternativen Signalpeptiden bzw. mit nativem Signalpeptid als Kontrolle wurden bei 37 °C für 22 h im Schüttelkolben (50 mL Kulturvolumen) kultiviert und die Aktivität im zellfreien Überstand 22 h nach Induktion mittels NIPAB-Assay in Dreifachbestimmung bei 37 °C bestimmt. Modifiziert nach (Bischoff 2019; Menke 2020).

Alle untersuchten BmasPGA-Klone mit alternativen Signalpeptiden zeigten nach 22-stündiger Kultivierung eine zwischen 4,3- und 11,7-fach höhere Aktivität im Überstand als die Kontrolle mit dem nativen Signalpeptid. Damit war die Steigerung zwar geringer als im Screening, aber insgesamt konnten die hohen Aktivitäten im Überstand durch Sekretion mit alternativen Signalpeptiden im größeren Maßstab reproduziert werden. Die maximale Enzymaktivität im Überstand entsprach mit 0,52 U/mL der im Überstand mit der nativen BmPGA (Abbildung 17). Die Optimierung der sekretierten BmasPGA-Menge durch Screening alternativer Signalpeptide war somit auch im größeren Maßstab erfolgreich. Als nächstes wurde durch Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierung bestimmt, welche Signalpeptide bei den einzelnen Klonen zum jeweiligen Sekretionserfolg geführt hatten. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Signalpeptide der pMSPs mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit in den untersuchten Klonen vorkamen. Es wurden insgesamt 49 Klone aus den Screenings mit Signalpeptiden von pMSP3 sequenziert (Abbildung 66 und 67). Dabei konnten nur 11 von 18 möglichen Signalpeptiden in den untersuchten Klonen gefunden werden. Das am häufigsten gefundene Signalpeptid war SP 6, das von einem konservierten hypothetischen Protein aus *B. megaterium* DSM319 stammte. Es machte mit 19 von 49 getesteten Klonen 39 % aller getesteten Klone aus (Tabelle 33). Bei Klonen mit Signalpeptiden von pMSP4 konnten bei 44 sequenzierten Klonen ebenfalls 11 von 18 möglichen Signalpeptiden gefunden werden. Das häufigste SP 9 von einem Protein der ErfK/YbiS/YcfS/YnhG-Familie kam in 25 % der Klone vor (Tabelle 34). Bei Klonen mit Signalpeptiden von pMSP5 konnten bei elf sequenzierten Klonen sieben von 18 möglichen Signalpeptiden nachgewiesen werden. Das häufigste SP 15 von einem konservierten hypothetischen Protein aus *B. megaterium* DSM319 kam dabei viermal vor (Tabelle 35).

Tabelle 33: Identität der Signalpeptide von pMSP3, die in den einzelnen Klonen zur Sekretion der BmasPGA geführt haben.

Signalpeptid	Ursprungprotein	Identifikationsnummer	Anzahl Klone	Klone
SP 2	β -Amylase	ADF37268.1	3	C3b, C6b, F6b
SP 3	D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase	ADF36976.1	1	F7a
SP 5	Extrazelluläre Ribonuclease	ADF37267.1	4	C6a, D7a, F8a, F7b
SP 6	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF37446.1	19	A2a, A4a, B4a, C1a, C2a, D1a, D4a, D6a, D8a, E5a, F2a, F3a, F4a, F5a, F6a, C4b, D3b, E1b, E3b
SP 7	Alkalische Phosphatase	ADF38066.1	2	E1a, A4b
SP 10	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF39852.1	4	B5a, B6a, D2a, F1a
SP 11	Hypothetisches Protein BMD_3152	ADF39992.1	2	C8a, E3a
SP 15	Hypothetisches Protein BMD_2027	ADF38880.1	2	A1a, B7a
SP 16	Bacillolysin-Vorläufer (neutrale Protease)	ADF39133.1	2	E7a, B2b
SP 17	Protein der VanW-Familie	ADF39282.1	4	B3a, B8a, E6a, A1b
SP 18	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase cwIB	ADF39902.1	6	A5a, B2a, C3a, D3a, E2a, E4a

Tabelle 34: Identität der Signalpeptide von pMSP4, die in den einzelnen Klonen zur Sekretion der BmasPGA geführt haben.

Signalpeptid	Ursprungprotein	Identifikationsnummer	Anzahl Klone	Klone
SP 1	Hypothetisches Protein BMD_3427	ADF40267.1	3	A1, D8, E2
SP 3	Polysaccharid-Deacetylase	ADF40719.1	1	C1
SP 4	Signalpeptid-Peptidase SppA	ADF41608.1	4	C2, D4, E1, F1
SP 5	Protein der Peptidase-M23-Familie	ADF41874.1	8	A3, B4, C6, D1, D2, E3, E8, F5
SP 6	Levansucrase	ADF38395.1	1	B1
SP 7	Protein der Phospholipase-/ Carboxylesterase-Familie	ADF37374.1	1	A4
SP 9	Protein der ErfK/YbiS/YcfS/YnhG-Familie	ADF37131.1	11	A8, B8, C3, C4, C5, C8, D5, D6, E6, F2, F3
SP 10	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF37220.1	2	B2, B7
SP 11	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF37360.1	1	A7
SP 16	Protein der AhpC/TSA-Familie	ADF39390.1	5	A5, A6, B6, D3, F4
SP 17	Sporenkortex-lytisches Enzym	ADF40060.1	7	B3, B5, C7, D7, E4, E7, F6

Tabelle 35: Identität der Signalpeptide von pMSP5, die in den einzelnen Klonen zur Sekretion der BmasPGA geführt haben.

Signalpeptid	Ursprungprotein	Identifikationsnummer	Anzahl Klone	Klone
SP 1	Hypothetisches Protein BMD_2542	ADF39387.1	1	A8
SP 2	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF40202.1	1	A6
SP 9	L-Asparaginase II	ADF40566.1	1	B1
SP 10	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF40777.1	2	A7, C2
SP 11	D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase	ADF41191.1	1	A4
SP 15	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF38000.1	4	A1, A3, A5, B5
SP 17	Konserviertes hypothetisches Protein	ADF37280.1	1	A2

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde vorab angenommen, dass durch Amplifikation des gesamten Plasmids die korrespondierenden Gene aller Signalpeptide gleich häufig vorliegen und entsprechend gleichmäßig auf die Vektoren mit *bmaspga*-Gen aufgeteilt würden. Dies war allerdings nicht der Fall. Möglicherweise bildeten sich bei einigen *signalpeptid*-Genen durch komplementäre Abschnitte Sekundärstrukturen aus, die zu der veränderten Einbaurate führten. Weiterhin wäre es möglich, dass sich mehrere *signalpeptid*-Gene untereinander zusammengelagert haben oder durch

komplementäre Abschnitte an den Vektor gelagert waren, sodass weniger von diesen *signalpeptid*-Genen frei vorlagen und mit geringerer Wahrscheinlichkeit in den Zielvektor mit dem *bmaspga*-Gen ligiert wurden.

Durch Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierung konnte ebenfalls festgestellt werden, welche Signalpeptide zu den größten Aktivitäten von BmasPGA und damit der größten sekretierten BmasPGA-Menge geführt haben. Dies waren das Signalpeptid der β -Amylase aus *B. megaterium* DSM319, das als SP 2 auf pMSP3 vorliegt, mit einer Aktivität von 0,52 U/mL und das Signalpeptid einer extrazellulären Ribonuclease (SP 5 von pMSP3) mit einer Aktivität im Überstand von 0,50 U/mL. Außerdem zeigten die Signalpeptide von einer D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase (SP 3 von pMSP3), einer alkalischen Phosphatase (SP 7 von pMSP3), eines Proteins der ErfK/YbiS/YcfS/YnhG-Familie (SP 9 von pMSP4), eines konservierten hypothetischen Proteins (ADF37360.1, SP 11 von pMSP4), eines hypothetischen Proteins BMD_2542 (SP 1 von pMSP5), eines konservierten hypothetischen Proteins (SP 2 von pMSP5) und der L-Asparaginase II (SP 9 von pMSP5) eine gute Sekretion der BmasPGA. Von den Ursursproteinen dieser Signalpeptide zählen fünf zur Enzymklasse der Hydrolasen wie auch die PGA, eins zu den Transferasen und drei sind hypothetische Proteine. Signalpeptide von Hydrolasen könnten sich also am besten zur Sekretion der BmasPGA eignen. Durch die unbekannte Funktion der hypothetischen Proteine kann dies allerdings nur vermutet werden. Es müssten weitere Untersuchungen zur Bestätigung durchgeführt werden.

Um zu analysieren, ob gleiche Signalpeptide in verschiedenen Klonen des Screenings zu einer ähnlichen Aktivität im Überstand geführt haben, wurden die nachgewiesenen Signalpeptide von pMSP3 und 4 gegen die jeweilige Enzymaktivität im Überstand als Boxplot-Darstellung aufgetragen (Abbildung 71). Für Signalpeptide von pMSP5 zeigten wenige Klone Aktivität, welche fast alle unterschiedliche Signalpeptide aufwiesen, sodass auf die Boxplot-Darstellung verzichtet wurde.

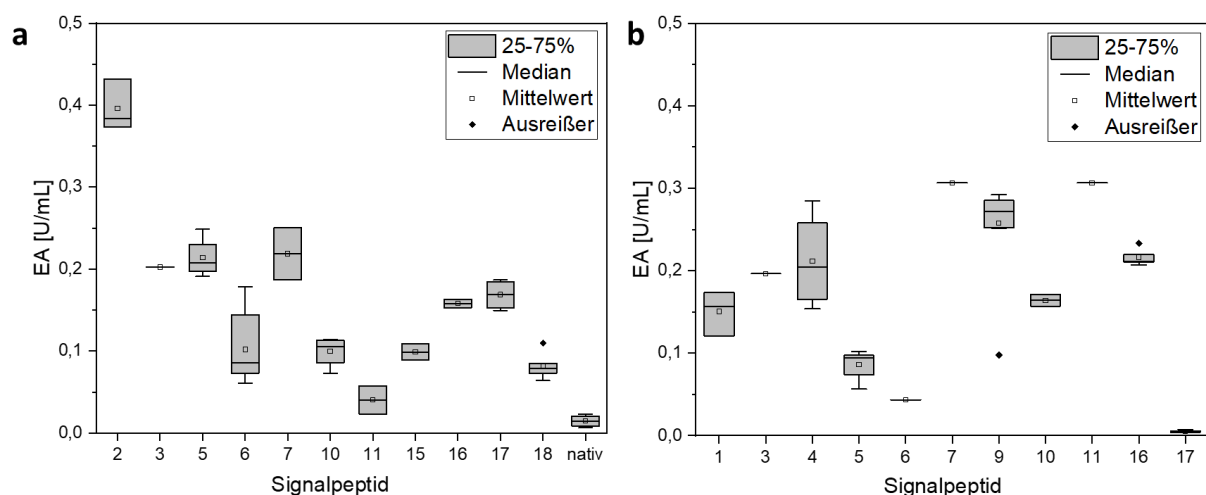


Abbildung 71: Box-Pot-Darstellung der Enzymaktivitäten von BmasPGA im Überstand, die durch Sekretion mit bestimmten Signalpeptiden von pMSP3 (a) und pMSP4 (b) erreicht wurden. In (a) ist außerdem die Aktivität der BmasPGA sekretiert mit dem natürlichen Signalpeptid aller Screenings mit aufgetragen.

Es zeigte sich, dass die gleichen Signalpeptide zu ähnlichen Aktivitäten im Überstand geführt haben. Die Boxen waren meist relativ schmal und es gab nur wenige Ausreißer, darunter ein Klon mit SP 9 aus pMSP4. Dieser könnte durch eine schlecht gewachsene Kultur zustande gekommen sein, da alle weiteren 10 Klone mit diesem Signalpeptid eine enge Verteilung der Aktivität zeigten. Alle

Signalpeptide außer SP 17 von pMSP4 führten verglichen mit der Sekretion mit dem nativen Signalpeptid zu einer höheren Aktivität im Überstand. Zur höchsten Aktivität der BmasPGA im Screening von 0,4 U/mL führte das SP 2 von pMSP3, bei dem es sich um das Signalpeptid der β -Amylase aus *B. megaterium* DSM319 handelt (Abbildung 71).

Da die Menge der sekretierten BmasPGA nun der Menge der sekretierten BmPGA entsprach, sollte die BmasPGA zur weiteren Charakterisierung gereinigt werden. Wegen eines isoelektrischen Punktes von 6,23, der damit zwischen Bm- und FJAT-PGA lag, wurde die Kationenaustauschchromatographie gewählt. In den Elutionsfraktionen mit 200 bzw. 300 mM NaCl waren dicke Proteinbanden bei relativen Molekulargewichten von 27.000 und 60.000 im SDS-Gel erkennbar, welche die α - und β -Untereinheit der BmasPGA darstellen. In den weiteren Elutionsfraktionen mit höherem Salzgehalt waren noch einige größere Proteine erkennbar, die mithilfe der Kationenaustauschchromatographie gut von der BmasPGA getrennt werden konnten (Abbildung 72). Bei der Reinigung konnte eine Ausbeute von 23,9 mg_{BmasPGA}/L_{Kultur} erzielt werden, die damit höher lag als die von Bt- und BmPGA (14,8 bzw. 20,6 mg/L), aber niedriger als die der FJAT-PGA (30,2 mg/L). Allerdings könnte die Ausbeute der Reinigung wahrscheinlich erhöht werden, da laut SDS-Gel noch ungebundenes Protein im Durchfluss und der ersten Waschfraktion nachweisbar war (Abbildung 72). Dazu müsste zukünftig ein größeres Säulenvolumen verwendet werden. Die spezifische Aktivität der BmasPGA wurde bestimmt und war mit $(9,96 \pm 0,24)$ U/mg etwas geringer als die der BmPGA (11,96 U/mg). Die Schmelztemperatur der BmasPGA entsprach mit $(64,67 \pm 0,24)$ °C der der BtPGA und lag damit 8 °C über der Schmelztemperatur der BmPGA.

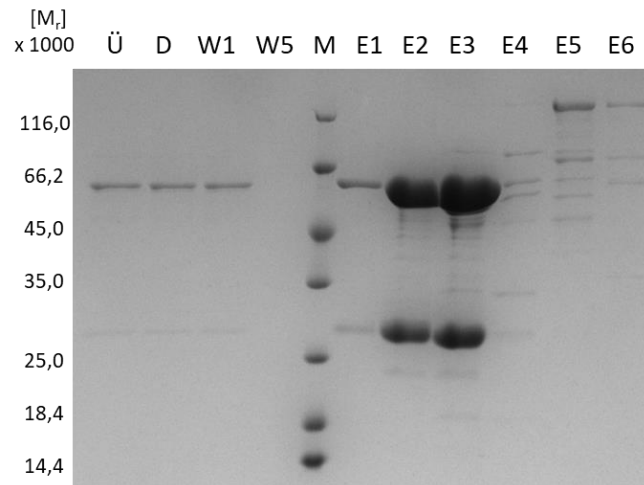


Abbildung 72: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von BmasPGA durch Kationenaustauschchromatographie (SP-Sepharose). *B. megaterium* MS941 mit dem entsprechenden Plasmid (pJMBm84) zur Produktion der BmasPGA wurde in 200 mL LB-Medium bei 37 °C kultiviert und der zellfreie Kulturüberstand durch Zentrifugation und Sterilfiltration erhalten. Alle Fraktionen der Reinigung wurden gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert. Kulturüberstand (Ü), Durchfluss (D), Waschfraktionen (W), Marker (M, Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific), Elutionsfraktionen (E). Zur Elution wurde 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 5,5) mit 100 (E1) bis 600 mM NaCl (E6) benutzt.

Zusammenfassend deutete sich das große Potential dieser plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek zur Verbesserung der Sekretion rekombinanter Proteine mit *B. megaterium* an. Die zuvor mit ihrem nativen Signalpeptid in *B. megaterium* kaum sekretierte BmasPGA konnte durch Identifikation effizienter Signalpeptide um mehr als das 10-fache gesteigert werden. Dadurch wurde eine Reinigung

und weitere Charakterisierung der BmasPGA ermöglicht. Die Methode könnte sich besonders für zuvor schlecht sekretierte rekombinante Proteine eignen. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten zukünftig weitere PGAs wie die BnPGA oder UNC-PGA und auch weitere bisher schlecht sekretierte Proteine für das Screening eingesetzt werden.

Der große Vorteil dieser plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek liegt in einem stark verringerten Arbeitsaufwand durch die Amplifikation der Signalpeptide mit *E. coli* und die Transformation als Plasmidmix mit den unterschiedlichen Signalpeptiden. Im Gegensatz dazu wurde beim ersten, dokumentierten Screening mit allen *B. subtilis* Signalpeptiden jedes der 173 Signalpeptide einzeln durch PCR amplifiziert und *B. subtilis* einzeln mit den konstruierten Plasmiden transformiert. Durch diesen hohen Aufwand wurde allerdings gewährleistet, dass alle Signalpeptide getestet werden (Brockmeier et al. 2006). Bei der Sequenzierung der Klone aus der plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek zeigte sich hingegen, dass die Signalpeptide unterschiedlich oft in den getesteten Klonen vertreten waren. Um möglichst alle Signalpeptide abzudecken, müssten hier künftig eine größere Menge an Klonen getestet werden. Insgesamt konnte durch die Aufteilung der Signalpeptide auf zehn pMSPs der Screeningaufwand bereits durch Organisation in einzelne Screeningansätze verringert werden. Dadurch mussten beispielsweise bei der Optimierung der BmasPGA-Sekretion gar nicht alle pMSPs getestet werden, um ein geeignetes Signalpeptid zu identifizieren.

Die hier verwendete plasmidbasierte Signalpeptid-Bibliothek ist das erste System für den Produktionsorganismus *B. megaterium*. Für *B. subtilis* wurden bereits einige Screenings verschiedener Signalpeptide durchgeführt. Meist wurden die 173 Signalpeptide aus dem ersten Screening von Brockmeier et al. (2006) verwendet und die Methode angepasst, indem beispielsweise alle 173 *B. subtilis* Signalpeptide einzeln durch PCR amplifiziert, als Mix in Vektoren ligiert und *B. subtilis* mit diesem Vektormix transformiert wurde. Mehr als 1500 Klone wurden auf die Sekretion der α -Amylase untersucht, was einer mehr als 8-fachen Überprobung entsprach. Die besten 100 Klone wurden sequenziert und 15 SPs identifiziert, die bis zu einer 1,7-fachen Steigerung der Sekretion im Vergleich zum nativen Signalpeptid führten (Fu et al. 2018). Die *B. subtilis* Signalpeptid-Bibliothek wurde außerdem in *Corynebacterium glutamicum* getestet. Hier zeigte sich wie auch in dieser Arbeit, dass sich die Sekretionseffizienz einer Protein-Signalpeptid-Kombination in verschiedenen Organismen unterscheiden kann und deshalb für jeden Wirtsorganismus eine geeignete Kombination aus Signalpeptid und Protein identifiziert werden muss (Hemmerich et al. 2016), (Kapitel 4.8.1). Des Weiteren wurden neben *B. subtilis* und *C. glutamicum* auch Signalpeptid-Bibliotheken in weiteren Produktionsorganismen wie *Pichia pastoris* (Duan et al. 2019) oder *Lactobacillus plantarum* (Mathiesen et al. 2009) getestet. Dies unterstreicht die große Bedeutung der Verbesserung der Sekretion für eine Anwendung der rekombinanten Produktion von Zielproteinen. Hierfür eignet sich *B. megaterium* besonders gut, da beispielsweise, wie oben gezeigt, deutlich weniger verunreinigende Wirtsproteine sekretiert werden als bei *B. subtilis* (Kapitel 4.8.1). Außerdem zeigt *B. megaterium* im Vergleich zu *B. subtilis* eine geringere Proteaseaktivität im umgebenden Medium (Bunk et al. 2010) und die eingebrachten Plasmide weisen eine hohe Stabilität auf (Meinhardt et al. 1989).

Insgesamt bestätigten diese wie die Ergebnisse aus der Literatur, dass es bis heute noch nicht möglich ist, optimale Signalpeptide für die Sekretion von rekombinanten Proteinen vorherzusagen (Hemmerich

et al. 2016; Fu et al. 2018) . Deshalb müssen diese mithilfe eines schnellen und einfaches Klonierungs- und Screeningsystem identifiziert werden. In dieser Arbeit konnten für die neuartige PGA aus *B. massiliogorillae* mehrere Signalpeptide identifiziert werden, die zu einer mehr als 10-fachen Steigerung der sekretierten Proteinmenge verglichen mit der Sekretion über das native Signalpeptid führten, und so eine Produktion, Sekretion, Reinigung und erste Charakterisierung der BmasPGA mit *B. megaterium* ermöglicht werden.

5 Zusammenfassung

Penicillin G Acylasen (PGAs) sind Schlüsselenzyme für die biotechnologische Herstellung von semi-synthetischen β -Lactam-Antibiotika. Neben der industriell verwendeten, aber wenig thermostabilen PGA aus *E. coli* wurden in dieser Arbeit hypothetische, neuartige PGAs aus *Bacillus* spp. durch Datenbanksuche mittels BLAST-Algorithmus basierend auf der Aminosäuresequenz der PGA aus *B. megaterium* (BmPGA) für eine zukünftige Anwendung identifiziert. Diese wurden mit *B. megaterium* erfolgreich produziert, sekretiert und experimentell als aktive PGAs bestätigt. Durch die Produktion und Sekretion mit *B. megaterium* konnten diese, im Gegensatz zur intrazellulären Produktion in *E. coli*, direkt aus dem Kulturüberstand gereinigt werden. Zwei neuartige PGAs aus *B. thermotolerans* (BtPGA) und *B. sp.* FJAT-27231 (FJAT-PGA) wiesen mit 64,5 und 73,3 °C um bis zu 16,5 bzw. 23 °C gesteigerte Thermostabilitäten gegenüber der BmPGA bzw. EcPGA auf. Diese neuen PGAs wurden weiterhin auf Hydrolyse verschiedener Substrate im Vergleich zu EcPGA und BmPGA getestet. Dabei zeigte sich, dass das Substratspektrum der PGAs aus *Bacillus* spp. ähnlich zur EcPGA war. Allerdings war die Aktivität vor allem der FJAT-PGA bei der Hydrolyse von Penicillin G und weiteren Substraten deutlich höher als die der bekannten EcPGA.

Außerdem wurden die Proteinstrukturen der drei heterodimeren PGAs aus *B. megaterium*, *B. thermotolerans* und *B. sp.* FJAT-27231 als die ersten Strukturen von PGAs aus Gram-positiven Bakterien aufgeklärt. Auf dieser Grundlage wurden Hybrid-PGAs, die aus Untereinheiten verschiedener Spezies bestehen, und Single-chain PGAs, bei denen die beiden Untereinheiten durch einen artifiziellen Linker kovalent verbunden wurden, erfolgreich produziert und gereinigt. Sie erwiesen sich als aktive Katalysatoren. Die Thermostabilität einer Single-chain PGA erhöhte sich so im Vergleich zur FJAT-PGA um weitere 3,7 °C, während die Schmelzpunkte der Hybrid-PGA zwischen denen der ursprünglichen Varianten lagen, wobei kein direkter Einfluss der einzelnen Untereinheiten erkennbar war.

Weiterhin wurden die BmPGA, BtPGA und FJAT-PGA als quervernetzte Enzymkristalle (CLECs) immobilisiert, um die Prozessstabilität zu erhöhen und eine Wiederverwendbarkeit zu ermöglichen. Die Untersuchung der mechanischen Stabilität der CLECs zeigte, dass die FJAT-PGA-CLECs unter den untersuchten PGA-CLECs am stabilsten und gleichzeitig noch aktiv waren. Um größere Mengen an CLECs herstellen zu können, konnte außerdem die Kristallisierbarkeit der FJAT-PGA durch Reduktion der Oberflächenentropie verbessert werden. Dabei wurden neun flexible Aminosäurereste (Lysin und Glutaminsäure) auf der Enzym-Oberfläche durch Alanin ersetzt. Bei diesen Varianten entstanden bereits nach wenigen Minuten Kristalle.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte außerdem die Sekretion einer weiteren PGA aus *B. massiliogorillae* durch Screening einer plasmidbasierten Signalpeptid-Bibliothek verbessert und so erstmalig eine Reinigung und Charakterisierung dieser PGA ermöglicht werden.

Zusammengefasst bilden die in dieser Arbeit identifizierten, hochaktiven und thermostabilen PGAs zusammen mit den eingesetzten Protein-Engineering-Experimenten, der Immobilisierung und ersten Analysen der Substratspektren die Grundlage für die Etablierung neuer PGA-basierter biotechnologischer Prozesse.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue, thermostabile PGAs identifiziert und diese strukturell sowie biochemisch charakterisiert werden. Bei der durchgeführten Analyse der Hydrolyse-Aktivität dieser PGAs gegenüber verschiedenen Substraten war speziell die FJAT-PGA bei der Hydrolyse von Penicillin G deutlich aktiver als die bekannte EcPGA, sodass die FJAT-PGA durch weitere Optimierung von Aktivität und Stabilität eine gute Alternative für die Industrie darstellen könnte. Zukünftig sollte erneut versucht werden, eine Struktur der FJAT-PGA mit Substrat zu erhalten, um deren Aktivität durch Protein Engineering im aktiven Zentrum weiter gezielt zu optimieren und möglicherweise das Substratspektrum zu erweitern.

Neben der Hydrolyse sollten zukünftig weiterhin die Synthese-Aktivitäten der identifizierten PGAs untersucht werden, um neben der Bereitstellung von Vorläufermolekülen auch semi-synthetische β -Lactam-Antibiotika herstellen zu können. Für eine Verbesserung der Synthese könnten zudem gezielte Aminosäureaustausche in der Nähe des aktiven Zentrums sorgen.

Neben einer generellen Steigerung der Sekretion von allen rekombinanten PGAs mit *B. megaterium* durch den Einsatz der Signalpeptid-Bibliothek muss zur möglichen Etablierung neuer PGA-basierter biotechnologischer Prozesse weiterhin auch eine Maßstabsvergrößerung von Produktion, Reinigung und Kristallisation der PGAs erfolgen. Mit quervernetzten Enzymkristallen (CLECs) wurde eine Methode zur Immobilisierung der PGA etabliert. Durch die Reduktion der Oberflächenentropie konnte die Kristallisierbarkeit einer FJAT-PGA-Variante bereits verbessert werden und eine erste Maßstabsvergrößerung ermöglicht werden. Durch weiteres Protein Engineering soll die Kristallisierbarkeit zukünftig beispielsweise durch Entfernung flexibler Regionen weiter optimiert werden, um so die Entropie weiter zu reduzieren und die Kristallbildung zu beschleunigen. Dadurch könnte auch eine Kristallisation direkt aus dem zellfreien Kulturüberstand als Reinigung und Formulierung der Enzyme ermöglicht und somit eine weitere Maßstabsvergrößerung erleichtert werden. Eine Bereitstellung größerer Mengen an CLECs sollte auch die quantitative Bestimmung der Aktivität der PGA-CLECs beispielsweise durch Bestimmung der CLEC-Trockenmasse ermöglichen. Zur weiteren Charakterisierung von PGA-CLECs sollten außerdem alle PGA-Varianten mikromechanisch untersucht werden. Zudem könnten im Hinblick auf die Etablierung von Prozessen die mechanischen Eigenschaften der CLECs unter prozessnäheren Bedingungen wie z.B. in einer Scherzelle oder im Rührkesselreaktor untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adikane H V., Thakar DM (2010) Studies of penicillin G acylase immobilization using highly porous cellulose-based polymeric membrane. *Appl Biochem Biotechnol* 160:1130–1145.
- Afonine P V., Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 68:352–367.
- Alkema WB, Hensgens CM, Kroezinga EH, de Vries E, Floris R, van der Laan JM, Dijkstra BW, Janssen DB (2000) Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. *Protein Eng* 13:857–63.
- Alkema WBL, Dijkhuis AJ, De Vries E, Janssen DB (2002a) The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. *Eur J Biochem* 269:2093–2100.
- Alkema WBL, Prins AK, De Vries E, Janssen DB (2002b) Role of α Arg145 and β Arg263 in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 365:303–309
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, Dijk JM Van, Hecker M (2001) A Proteomic View on Genome-Based Signal Peptide Predictions. *Genome Res* 11:1484–1502.
- Arnold FH (2018) Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew Chemie - Int Ed* 57:4143–4148.
- Balasingham K, Warburton D, Dunnill P, Lilly MD (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* 276:250–256.
- Balci H, Ozturk MT, Pijning T, Ozturk SI, Gumusel F (2014) Improved activity and pH stability of *E. coli* ATCC 11105 penicillin acylase by error-prone PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4467–4477.
- Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R (2014) Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv* 4:1583–1600.
- Basso A, Serban S (2019) Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol Catal* 479:110607.
- Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JHC, Rolinson GN (1959) Synthesis of Penicillin: 6-Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentations. *Nature* 183:257–258.
- Baumgarten L (2019) Erzeugung und Analyse einer Signalpeptid-Bibliothek zur optimierten Proteinsekretion in *Bacillus megaterium*. Masterarbeit, TU Braunschweig
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
- Biedendieck R, Beine R, Gamer M, Jordan E, Buchholz K, Seibel J, Dijkhuizen L, Malten M, Jahn D (2007) Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1062–1073.
- Biedendieck R, Borgmeier C, Bunk B, Stammen S, Scherling C, Meinhardt F, Wittmann C, Jahn D (2011) Systems biology of recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. *Methods Enzymol* 500:165–195.
- Bilal M, Zhao Y, Noreen S, Shah SZH, Bharagava RN, Iqbal HMN (2019) Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: a review from immobilization strategies viewpoint. *Biocatal Biotransformation* 37:159–182.
- Bischoff LG (2019) Untersuchung zur Verbesserung der Sekretion von Penicillin G Acylase in *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit, TU Braunschweig
- Boeckel TP Van, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010 : an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 3099:1–9.
- Bommarius A, Riebel-Bommarius B (2004) Biocatalysis: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Weinheim
- Bommarius AS, Blum JK, Abrahamson MJ (2011) Status of protein engineering for biocatalysts: How to design an industrially useful biocatalyst. *Curr Opin Chem Biol* 15:194–200.

- Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485:185–194.
- Bornscheuer UT, Pohl M (2001) Improved biocatalysis by directed evolution and rational protein design. *Biocatal Biotransformation* 5:137–143.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–54.
- Brady D, Jordaan J (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett* 31:1639–1650.
- Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F (2013) Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods Mol Biol* 1051:15–31.
- Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T (2006) Systematic Screening of All Signal Peptides from *Bacillus subtilis*: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria. *J Mol Biol* 362:393–402.
- Brown BJ, Carlton BC (1980) Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 142:508–512.
- Buchholz K (2016) A breakthrough in enzyme technology to fight penicillin resistance—industrial application of penicillin amidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3825–3839.
- Bunk B, Schulz A, Stammen S, Münch R, Warren MJ, Rohde M, Jahn D, Biedendieck R (2010) A short story about a big magic bug. *Bioeng Bugs* 1:85–91.
- Burkhardt A, Pakendorf T, Reime B, Meyer J, Fischer P, Stübe N, Panneerselvam S, Lorbeer O, Stachnik K, Warmer M, Rödig P, Göries D, Meents A (2016) Status of the crystallography beamlines at PETRA III. *Eur Phys J Plus* 131:0–8.
- Bush K, Bradford PA (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a025247.
- Buß O, Müller D, Jäger S, Rudat J, Rabe KS (2018) Improvement in the Thermostability of a β -Amino Acid Converting ω -Transaminase by Using FoldX. *ChemBioChem* 19:379–387
- Campos Muñiz C, Cuadra Zelaya TE, Rodríguez Esquivel G, Fernández Perrino FJ (2007) Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Rev Latinoam Microbiol* 49:88–98.
- Carpenter JF, Crowe JH (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25:244–255.
- Caspers M, Brockmeier U, Degering C, Eggert T, Freudl R (2010) Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1877–1885.
- Chand D, Varshney N, Ramasamy S, Panigrahi P, Brannigan JA, Wilkinson AJ, Suresh CG (2015) Structure mediation in substrate binding and post-translational processing of penicillin acylases: information from mutant structures of *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase. *Protein Sci* 24:1660–1670.
- Chandel AK, Rao LV, Narasu ML, Singh O V. (2008) The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb Technol* 42:199–207.
- Chen M, Nagarajan V (1994) Effect of alteration of charged residues at the N termini of signal peptides on protein export in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:5796–5801.
- Chen R (2001) Enzyme engineering: Rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol* 19:13–14.
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 66:12–21.
- Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF (2003) Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* 20:1325–1336.
- Chiang C, Bennett RE (1967) Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 93:302–308.
- Chmiel H (ed) (2011) Bioprozesstechnik, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Chow EHH, Bučar D-K, Jones W (2012) New opportunities in crystal engineering – the role of atomic force microscopy in studies of molecular crystals. *Chem Commun* 48:9210.

- Chruszcz M, Potrzebowski W, Zimmerman MD, Grabowski M, Zheng H, Lasota P, Minor W (2008) Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals - does symmetry matter? *Protein Sci* 17:623–632.
- Claridge CA, Gourevitch A, Lein J (1960) Bacterial Penicillin Amidase. *Nature* 187:237–238.
- Cobos-Puc L, Rodríguez-Herrera R, Cano-Cabrera JC, Aguayo-Morales H, Silva-Belmares SY, Flores Gallegos AC, Martínez Hernández JL (2020) Classical and New Pharmaceutical Uses of Bacterial Penicillin G Acylase. *Curr Pharm Biotechnol* 21:287–297.
- Cole M (1969) Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem J* 115:733–739.
- Cooper DR, Boczek T, Grelewski K, Pinkowska M, Sikorska M, Zawadzki M, Derewenda Z (2007) Protein crystallization by surface entropy reduction: Optimization of the SER strategy. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 63:636–645.
- Cui X, He Q, Shen D, Jiang Z, Chen Y, Zhao S, Hammock BD (2018) Production and characterization of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein for glycocholic acid detection in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Methods* 10:2629–2635.
- D'Arcy A, Bergfors T, Cowan-Jacob SW, Marsh M (2014) Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: what have we learned? *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* 70:1117–1126.
- Dalbey RE, Wang P, van Dijl JM (2012) Membrane Proteases in the Bacterial Protein Secretion and Quality Control Pathway. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:311–330.
- Daumy GO, Danley D, McColl AS, Apostolakis D, Vinick FJ (1985) Experimental evolution of penicillin G acylases from *Escherichia coli* and *Proteus rettgeri*. *J Bacteriol* 163:925–932.
- Dauids T, Schmidt M, Böttcher D, Bornscheuer UT (2013) Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 17:215–220.
- De Bary A (1884) Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien. Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Deng S, Su E, Ma X, Yang S, Wei D (2015) Efficient enzymatic synthesis of ampicillin by mutant *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase. *J Biotechnol* 199:62–68.
- Derewenda ZS (2004) Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure* 12:529–535.
- Diamond R (1974) Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *J Mol Biol* 82:371–391.
- Duan G, Ding L, Wei D, Zhou H, Chu J, Zhang S, Qian J (2019) Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 306:193–202.
- Duggleby H, Tolley S, Hill C, Dodson E (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* 373:264–68
- Edman P, Begg G (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1:80–91.
- Elgersma A V., Ataka M, Katsura T (1992) Kinetic studies on the growth of three crystal forms of lysozyme based on the measurement of protein and Cl⁻ concentration changes. *J Cryst Growth* 122:31–40.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 66:486–501.
- Evans PR, Murshudov GN (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 69:1204–1214.
- Filippini M, Masiero G, Moschetti K (2006) Socioeconomic determinants of regional differences in outpatient antibiotic consumption: Evidence from Switzerland. *Health Policy (New York)* 78:77–92.
- Finger C, Gamer M, Klunkelfuß S, Bunk B, Biedendieck R (2015) Impact of rare codons and the functional coproduction of rate-limiting tRNAs on recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:8999–9010.
- Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their

- use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226–236.
- Flores G, Soberón X, Osuna J (2004) Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Sci* 13:1677–1683.
- Freudl R (2018) Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb Cell Fact* 17:1–10.
- Fu G, Liu J, Li J, Zhu B, Zhang D (2018) Systematic Screening of Optimal Signal Peptides for Secretory Production of Heterologous Proteins in *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* 66:13141–13151.
- Fu LL, Xu ZR, Li WF, Shuai JB, Lu P, Hu CX (2007) Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv* 25:1–12.
- Gibney E, Van Noorden R, Ledford H, Castelvechi D, Warren M (2018) ‘Test-tube’ evolution wins Chemistry Nobel Prize. *Nature* 562:176–176.
- Goldschmidt L, Cooper DR, Derewenda ZS, Eisenberg D (2007) Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci* 16:1569–1576.
- Grob P, Huber M, Walla B, Hermann J, Janowski R, Niessing D, Hekmat D, Weuster-Botz D (2020) Crystal Contact Engineering Enables Efficient Capture and Purification of an Oxidoreductase by Technical Crystallization. *Biotechnol J* 15:2000010.
- Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, Jahn D (2005) JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res* 33:526–531.
- Grulich M, Brezovský J, Štěpánek V, Palyzová A, Marešová H, Zahradník J, Kyslíková E, Kyslík P (2016) In-silico driven engineering of enantioselectivity of a penicillin G acylase towards active pharmaceutical ingredients. *J Mol Catal B Enzym* 133:S53–S59.
- Grunwald P (2017) Biocatalysis: biochemical fundamentals and applications, 2. Auflage. World Scientific Publishing Europe Ltd.
- Hamed MB, Anné J, Karamanou S, Economou A (2018) *Streptomyces* protein secretion and its application in biotechnology. *FEMS Microbiol Lett* 365:1–10.
- Hartmeier W (1985) Immobilized biocatalysts- from simple to complex systems. *Trends Biotechnol* 3:149–153.
- Hassan M (2016) Production, Immobilization and Industrial Uses of Penicillin G Acylase. *Int J Curr Pharm Rev Res* 8:11–22.
- Hekmat D (2015) Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. *Bioprocess Biosyst Eng* 38:1209–1231.
- Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, Jurischka S, Wiechert W, Freudl R, Oldiges M (2016) Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* 15:208.
- Hewitt L, Kasche V, Lummer K, Lewis RJ, Murshudov GN, Verma CS, Dodson GG, Wilson KS (2000) Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. *J Mol Biol* 302:887–98.
- Huang HT, English AR, Seto TA, Shull GM, Sobin BA (1960) Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins. *J Am Chem Soc* 82:3790–3791.
- Ignatova Z, Hörnle C, Kasche V, Nurk A (2002) Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the tat translocation machinery. *Biochem Biophys Res Commun* 291:146–149.
- Jaeger KE, Eggert T, Eipper A, Reetz MT (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:519–530.
- Jager SAW, Jekel PA, Janssen DB (2007) Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb Technol* 40:1335–1344.
- Jones CW (2018) Another Nobel Prize for Catalysis: Frances Arnold in 2018. *ACS Catal* 8:10913.
- Jurruš E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, Brookes DH, Wilson L, Chen J, Liles K, Chun M, Li P, Gohara DW, Dolinsky T, Konecny R, Koes DR, Nielsen JE, Head-Gordon T, Geng W, Krasny R, Wei GW, Holst MJ, McCammon JA, Baker NA (2018) Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci* 27:112–128.
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 66:125–132.

- Kaufmann KW, Lemmon GH, Deluca SL, Sheehan JH, Meiler J (2010) Practically useful: What the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry* 49:2987–2998.
- Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, Zhang ZG, Opperman DJ, Reetz MT, Acevedo JP (2013) Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth Biol* 2:83–92.
- Kleywegt GJ (1997) Validation of protein models from C(α) coordinates alone. *J Mol Biol* 273:371–376.
- Knuuti KT (2015) Natürliche Kompetenz und Proteinexport in *Bacillus megaterium* – Grundlagen und biotechnologische Anwendungen. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Koopmeiners J, Diederich C, Solarczek J, Voß H, Mayer J, Blankenfeldt W, Schallmeyer A (2017) HheG, a Halohydrin Dehalogenase with Activity on Cyclic Epoxides. *ACS Catal* 7:6877–6886.
- Korneli C, David F, Biedendieck R, Jahn D, Wittmann C (2013) Getting the big beast to work-systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *J Biotechnol* 163:87–96.
- Kourist R (2018) Protein-, Zell-Engineering für biokatalytische Prozesse, TU Graz news. <https://www.tugraz.at/tu-graz/services/news-stories/tu-graz-news/einzelsicht/article/protein-zell-engineering-fuer-biokatalytische-prozesse/>. Accessed 27 Jul 2020
- Ku T, Lu P, Chan C, Wang T, Lai S, Lyu P, Hsiao N (2009) Predicting melting temperature directly from protein sequences. *Comput Biol Chem* 33:445–450.
- Kubiak M, Solarczek J, Kampen I, Schallmeyer A, Kwade A, Schilde C (2018) Micromechanics of anisotropic cross-linked enzyme crystals. *Cryst Growth Des* 18:5885–5895.
- Kubiak M, Storm KF, Kampen I, Schilde C (2019) Relationship between Cross-Linking Reaction Time and Anisotropic Mechanical Behavior of Enzyme Crystals. *Cryst Growth Des* 19:4453–4464.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat Publ* 228:680–685.
- Lakowitz A (2017) Skalenübergreifende Produktion und Sekretion rekombinanter Proteine mit Stämmen der Gattung *Bacillus*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
- Lakowitz A, Godard T, Biedendieck R, Krull R (2018) Mini review: Recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different *Bacillus* strains and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 126:27–39.
- Lakowitz A, Krull R, Biedendieck R (2017) Recombinant production of the antibody fragment D1.3 scFv with different *Bacillus* strains. *Microb Cell Fact* 16:1–18.
- Lee TS, Turner MK, Lye GJ (2002) Mechanical Stability of Immobilized Biocatalysts (CLECs) in Dilute Agitated Suspensions. *Biotechnol Prog* 18:43–50.
- Li K, Mohammed MAA, Zhou Y, Tu H, Zhang J, Liu C, Chen Z, Burns R, Hu D, Ruso JM, Tang Z, Liu Z (2020) Recent progress in the development of immobilized penicillin G acylase for chemical and industrial applications: A mini-review. *Polym. Adv. Technol.* 31:368–388
- Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, Ellestad G (2004) Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal Biochem* 332:153–159.
- Lopez S, Rondot L, Leprêtre C, Marchi-Delapierre C, Ménage S, Cavazza C (2017) Cross-Linked Artificial Enzyme Crystals as Heterogeneous Catalysts for Oxidation Reactions. *J Am Chem Soc* 139:17994–18002.
- Lutz S (2010) Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol* 21:734–743.
- Malten M, Biedendieck R, Gamer M, Drews AC, Stammen S, Buchholz K, Dijkhuizen L, Jahn D (2006) A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl Environ Microbiol* 72:1677–1679.
- Malten M, Nahrstedt H, Meinhardt F, Jahn D (2005) Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnol Bioeng* 91:616–621.
- Marešová H, Plačková M, Grulich M, Kyslík P (2014) Current state and perspectives of penicillin G acylase-based biocatalyses. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2867–2879.

- Margolin AL (1996) Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol* 14:223–230.
- Margolin AL, Navia MA (2001) Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Angew Chem Int Ed* 40:2204–2222.
- Martinez R, Schwaneberg U (2013) A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. *Biol Res* 46:395–405.
- Mathiesen G, Sveen A, Brurberg M, Fredriksen L, Axelsson L, Eijsink VGH (2009) Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* 10:425.
- Mayer J, Pippel J, Günther G, Müller C, Lauermann A, Knuuti T, Blankenfeldt W, Jahn D, Biedendieck R (2019) Crystal structures and protein engineering of three different penicillin G acylases from Gram-positive bacteria with different thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7537–7552.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) *Phaser* crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658–674.
- McDonough M, Klei H, Kelly J (1999) Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. *Protein Sci* 8:1971–81.
- McPherson A, Cudney B (2014) Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* 70:1445–1467.
- McPherson A, Gavira JA (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Structural Biol Commun* 70:2–20.
- McVey CE, Walsh M a, Dodson GG, Wilson KS, Brannigan J a (2001) Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. *J Mol Biol* 313:139–150.
- Meinhardt F, Stahl U, Ebeling W (1989) Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:343–350.
- Menke ER (2020) Optimierung der Sekretion von Penicillin G Acylasen mithilfe einer Signalpeptid-Bibliothek. Bachelorarbeit, TU Braunschweig
- Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* 37:790–802.
- Müller C (2018) Optimierung der Sekretion und Untersuchungen der Stabilität von Penicillin G Acylasen aus *Bacillus* species. Masterarbeit, TU Braunschweig
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263–73.
- Nguyen HD, Phan TTP, Schumann W (2011) Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express* 1:1–11.
- Niesen FH, Berglund H, Vedadi M (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2:2212–2221.
- Nov Y (2012) When second best is good enough: Another probabilistic look at saturation mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 78:258–262.
- Nowotny P, Hermann J, Li J, Krautenbacher A, Klöpfer K, Hekmat D, Weuster-Botz D (2019) Rational Crystal Contact Engineering of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase To Promote Technical Protein Crystallization. *Crystr Growth Des* 19:2380–2387.
- Ohashi H, Katsuta Y, Hashizume T, Abe SN, Kajiura H, Hattori H, Kamei T, Yano M (1988) Molecular cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*. *Appl Environ Microbiol* 54:2603–2607.
- Overton TW (2014) Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today* 19:590–601.
- Pan X, Wang L, Ye J, Qin S, He B (2018) Efficient synthesis of β -lactam antibiotics with very low product hydrolysis by a mutant *Providencia rettgeri* penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:1749–1758
- Panigrahi P, Chand D, Mukherji R, Ramasamy S, Suresh CG (2015) Sequence and structure-based comparative analysis to assess, identify and improve the thermostability of penicillin G acylases. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:1493–1506.

- Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, Lobanov VS, Myslik J, Graf E, Carver T, Asel E, Springer BA, Lane P, Salemme FR (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* 6:429–440
- Parashar D, Satyanarayana T (2016) A chimeric α -amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43:473–484.
- Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, Kennedy JF (2000) Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv* 18:289–301.
- Patel RN (ed) (2016) *Green Biocatalysis*. John Wiley & Sons
- Patrick WM, Firth AE (2005) Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomol Eng* 22:105–112.
- Pei J, Grishin N V, Road FP (2014) PROMALS3D: Multiple Sequence Alignment Methods enhanced with evolutionary and 3-dimensional structural information. *Methods Mol Biol* 1079:263–271.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786.
- Pichlo C, Montada AA, Schacherl M, Baumann U (2016) Production, crystallization and structure determination of *C. difficile* PPEP-1 via microseeding and Zinc-SAD. *J Vis Exp* 118:e55022.
- Polizzi KM, Chaparro-Riggers JF, Vazquez-Figueroa E, Bommarius AS (2006) Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. *Biotechnol J* 1:531–536.
- Quiocho FA, Richards FM (1964) Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52:833–839.
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2004) Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. *J Biosci Bioeng* 97:1–13.
- Rajendhran J, Gunasekaran P (2007) Molecular cloning and characterization of thermostable β -lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*. *J Biosci Bioeng* 103:457–463.
- Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42:320–324.
- Robinson CR, Sauer RT (1998) Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5929–5934.
- Rojviriyaya C, Pratumrat T, Saper MA, Yuvaniyama J (2011) Improved X-ray diffraction from *Bacillus megaterium* penicillin G acylase crystals through long cryosoaking dehydration. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67:1570–1574.
- Rolinson GN, Batchelor FR, Butterworth D, Cameron-Wood J, Cole M, Eustace GC, Hart M V., Richards M, Chain EB (1960) Formation of 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by Enzymatic Hydrolysis. *Nature* 187:236–237.
- Roy JJ, Abraham ET (2004) Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem Rev* 104:3705–3722.
- Rygus T, Hillen W (1991) Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:594–599.
- Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R (2013) *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
- Sakaguchi K, Murao S (1950) A Preliminary Report on a New Enzyme, “Penicillin-amidase.” *J Agric Chem Soc Japan* 23:411.
- Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L (2005) The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Res* 33:382–388.
- Sheldon RA, Pereira PC (2017) Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem Soc Rev* 46:2678–2691.
- Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem Soc Rev* 42:6223–6235.
- Simoncsits A, Tjörnhammar M-L, Raskó T, Kiss A, Pongor S (2001) Covalent joining of the subunits of a homodimeric type II restriction endonuclease: single-chain PvuII endonuclease. *J Mol Biol* 309:89–97.

- Srirangan K, Orr V, Akawi L, Westbrook A, Moo-Young M, Chou CP (2013) Biotechnological advances on Penicillin G acylase: Pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies. *Biotechnol Adv* 31:1319–1332.
- St. Clair NL, Navia MA (1992) Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J Am Chem Soc* 114:7314–7316.
- Stammen S, Müller BK, Korneli C, Biedendieck R, Gamer M, Franco-Lara E, Jahn D (2010) High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* 76:4037–4046.
- Statista (2019a) E&Y - Deutscher Biotechnologie-Report 2019: Umsatzentwicklung der deutschen Biotech-Industrie in den Jahren 1999 bis 2018. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/12251/umfrage/umsatzentwicklung-in-der-deutschen-biotech-industrie/>. Accessed 9 Apr 2020
- Statista (2019b) EvaluatePharma - World Preview 2019, Outlook to 2024: Anteil von Biotechnologie am weltweiten Pharmaumsatz in den Jahren von 2006 bis 2024. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/311771/umfrage/verteilung-des-weltweiten-arzneimittelumsatzes-nach-produktionstechnologie/>. Accessed 9 Apr 2020
- Sumbalova L, Stourac J, Martinek T, Bednar D, Damborsky J (2018) HotSpot Wizard 3.0: Web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Res* 46:W356–W362.
- Szilágyi A, Závodszky P (2000) Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: Results of a comprehensive survey. *Structure* 8:493–504.
- Tickle IJ, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Sharff A, Vonnrhein C, Bricogne G (2018) STARANISO. Global Phasing Ltd., Cambridge, UK
- Tischer W, Kasche V (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol* 17:326–335.
- Tishkov VI, Savin SS, Yasnaya AS (2010) Protein engineering of penicillin acylase. *Acta Naturae* 2:47–61.
- Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois J-YF, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM (2004) Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:207–233.
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijk JM (2000) Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:515–547.
- Torres-Guzmán R, De La Mata I, Torres-Bacete J, Arroyo M, Castellón MP, Acebal C (2002) Substrate specificity of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Biochem Biophys Res Commun* 291:593–597.
- Torres LL, Cantero Á, Del Valle M, Marina A, López-Gallego F, Guisán JM, Berenguer J, Hidalgo A (2013) Engineering the substrate specificity of a thermophilic penicillin acylase from *thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 79:1555–1562.
- Unger J (2020) Herstellung und Reinigung verschiedener Penicillin G Acylase Varianten mit *Bacillus megaterium*. Bachelorarbeit, TU Braunschweig
- Vaghjiani JD, Lee TS, Lye GJ, Turner MK (2000) Production and characterisation of cross-linked enzyme crystals (CLECs®) for application as process scale biocatalysts. *Biocatal Biotransformation* 18:151–175.
- Valle F, Balbás P, Merino E, Bollvar F (1991) The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends Biochem Sci* 16:36–40.
- Varshney NK, Ramasamy S, Brannigan JA, Wilkinson AJ, Suresh CG (2013) Cloning, overexpression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a slow-processing mutant of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69:925–929.
- Varshney NK, Suresh Kumar R, Ignatova Z, Prabhune A, Pundle A, Dodson E, Suresh CG (2012)

- Crystallization and X-ray structure analysis of a thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 68:273–277.
- Vary PS (1994) Prime time for *Bacillus megaterium*. Microbiology 140:1001–1013.
- Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D (2007) *Bacillus megaterium* - from simple soil bacterium to industrial protein production host. Appl Microbiol Biotechnol 76:957–967.
- Vogt G, Argos P (1997) Protein thermal stability: Hydrogen bonds or internal packing? Fold Des 2:40–46.
- Voutilainen SP, Nurmi-Rantala S, Penttilä M, Koivula A (2014) Engineering chimeric thermostable GH7 cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 98:2991–3001.
- Wang J, Zhang Q, Huang H, Yuan Z, Ding D, Yang S, Jiang W (2007) Increasing synthetic performance of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* by site-directed mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol 74:1023–1030.
- Wang Y, Liu Y, Wang Z, Lu F (2014) Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Lett 36:1783–1789.
- Wen Y, Shi X, Yuan Z, Zhou P (2004) Expression, purification, and characterization of His-tagged penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 38:24–28.
- Wichmann JH (2020) Optimierung der rekombinanten Produktion und der Kristallisation verschiedener Proteinmutanten einer Penicillin G Acylase aus *Bacillus*. Masterarbeit, TU Braunschweig
- Wiencek JM (1999) New Strategies for Protein Crystal Growth. Annu Rev Biomed Eng 1:505–534.
- Wittchen KD, Meinhardt F (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. Appl Microbiol Biotechnol 42:871–877.
- Wu S-C, Yeung JC, Duan Y, Ye R, Szarka SJ, Habibi HR, Wong S-L (2002) Functional Production and Characterization of a Fibrin-Specific Single-Chain Antibody Fragment from *Bacillus subtilis*: Effects of Molecular Chaperones and a Wall-Bound Protease on Antibody Fragment Production. Appl Environ Microbiol 68:3261–3269.
- Xu M-Q, Wang S-S, Li L-N, Gao J, Zhang Y-W (2018) Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates as Biocatalysts. Catalysts 8:460.
- Xu Z, Cen YK, Zou SP, Xue YP, Zheng YG (2020) Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. Crit Rev Biotechnol 40:83–98.
- Yamane K, Bunai K, Kakeshita H (2004) Protein Traffic for Secretion and Related Machinery of *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem 68:2007–2023.
- Yan EK, Cao HL, Zhang CY, Lu QQ, Ye YJ, He J, Huang LJ, Yin DC (2015) Cross-linked protein crystals by glutaraldehyde and their applications. RSC Adv 5:26163–26174.
- Yang S, Zhou L, Tang H, Pan J, Wu X, Huang H, Yuan Z (2002) Rational design of a more stable penicillin G acylase against organic cosolvent. J Mol Catal B Enzym 18:285–290.
- Yang Y, Biedendieck R, Wang W, Gamer M, Malten M, Jahn D, Deckwer W-D (2006) High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. Microb Cell Fact 5:36.
- Yang Y, Malten M, Grote A, Jahn D, Deckwer W-D (2007) Codon Optimized Thermobifida fusca Hydrolase Secreted by Bacillus megaterium. Biotechnol Bioeng 96:780–794.
- Yao D, Su L, Li N, Wu J (2019) Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection. Microb Cell Fact 18:69.
- Zhang Q, Zhang L, Han H, Zhang Y (1986) A method for screening penicillin G acylase-producing bacteria by means of 2-nitro-5-phenylacetaminobenzoic acid test paper. Anal Biochem 156:413–416.
- Zheng F, Vermaas J V., Zheng J, Wang Y, Tu T, Wang X, Xie X, Yao B, Beckham GT, Luo H (2018) Activity and Thermostability of GH5 Endoglucanase Chimeras from Mesophilic and Thermophilic Parents. Appl Environ Microbiol 85:e02079-18.

8 Anhang

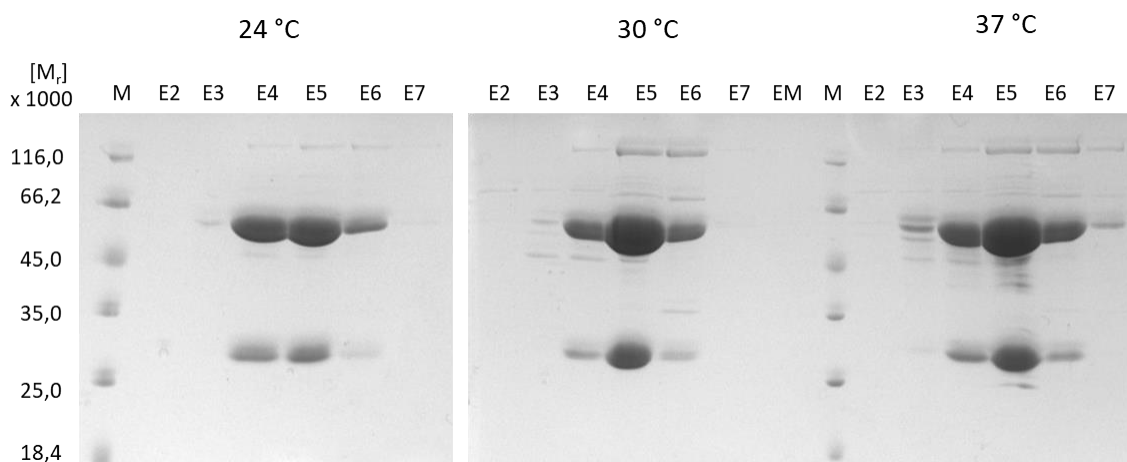


Abbildung 73: SDS-PAGEs der Fraktionen der Reinigungen der FJAT-PGA nach Kultivierung für 24 h bei 24, 30 und 37 °C. Zur Elution wurde 50 mM NaPh-Puffer (pH 5,5) mit 100 (E1) bis 700 mM NaCl (E7) bzw. 1 M (EM) benutzt.

Tabelle 36: Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung der PGA-Strukturen (Mayer et al. 2019).

	FJAT-PGA	BtPGA	BmPGA
Statistiken zur Datensammlung			
Beamline	SLS PXIII	Petrall P11	SLS PXIII
Wellenlänge (Å)	1,0000	0,9780	1,0003
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	H3	P2 ₁
Abmessungen der Einheitszelle			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	57,37; 77,69; 210,37	173,00; 173,00; 209,57	58,24; 77,96; 84,09
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 101,67, 90
Auflösungsbereich (Å)	46,15 – 1,36 (1,41 – 1,36)	49,45 – 2,27 (2,35 – 2,27)	46,03 – 2,20 (2,28 – 2,20)
Ellipsoidale ^a Auflösung (Å) (Richtung) ^b	-	-	2,18 (0.756 <i>a</i> * - 0.654 <i>c</i> *)
	-	-	2,19 (<i>b</i> *)
	-	-	3,04 (- 0.355 <i>a</i> * + 0.935 <i>c</i> *)
Gesamtzahl Reflexionen (ellipsoidal) ^c	2500361 (107456)	1135340 (56366)	169381 (7044)
Anzahl einzigartiger Reflexionen (ellipsoidal) ^{a,c}	202143 (9865)	108061 (5364)	25584 (1279)
Durchschnittliche Multiplizität ^c (sphärisch)	12,4 (10.9)	10,5 (10.5)	6,6 (5,5)
Vollständigkeit ^c (%) (sphärisch)	100 (100)	100 (100)	68,4 (16,7)
Vollständigkeit (ellipsoidal) ^{a,c,d} (%)	-	-	93,0 (54,2)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) ^c	14,3 (1,6)	13,2 (1,6)	9,0 (1,6) (sphärisch)
<i>R</i> _{meas} ^{c,e}	0,109 (1,749)	0,120 (1,628)	0,201 (1,273)
<i>R</i> _{pim} ^{c,f}	0,031 (0,521)	0,052 (0,702)	0,078 (0,540)

	FJAT-PGA	BtPGA	BmPGA
$CC_{1/2}^g$	0,999 (0,503)	0,999 (0,724)	0,993 (0,687)
Verfeinerungsstatistiken			
Auflösung (Å)	46,15 – 1,36 (1,41 – 1,36)	43,25 – 2,27 (2,35 – 2,27)	46,03 – 2,20 (2,28 – 2,20)
Anzahl verwendeter Reflexionen	202003 (19950)	107998 (10819)	25271 (92)
R_{work}^h (%)	14,88 (25,72)	17,23 (27,45)	21,46 (49,25)
R_{free}^i (%)	16,74 (27,14)	19,97 (33,13)	27,47 (84,29)
Anzahl Reste	1710	2188	977
Protein	730	1454	719
Wasser	970	721	256
Ca ²⁺	2	12	2
Liganden	9	1	-
Mittlerer B-Faktor ^j (Å ²)	23	56	38
Protein	20	56	39
Wasser	36	53	24
Ca ²⁺	16	69	40
Liganden	53	84	-
Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD, engl. Root Mean Square Deviation)			
Bindungslänge (Å)	0,011	0,003	0,002
Bindungswinkel (°)	1,20	0,57	0,50
Ramachandran-Plot (%)			
Bevorzugte Regionen	97,52	97,44	94,69
Erlaubte Regionen	2,34	2,49	5,17
Ausreißer	0,14	0,07	0,14
MolProbity Score ^k	1,05	1,01	1,57
PDB Code	6NVX	6NVY	6NVW

^aDie Statistiken beziehen sich auf mit STARANISO gekürzte Daten, um anisotrope Reflexionen zu entfernen (Tickle et al. 2018). ^bHier sind die Auflösungsgrenzen für drei Richtungen im reziproken Raum angegeben. Dazu wurde mit STARANISO ein Ellipsoid berechnet, das durch kleinste Quadrate an die Grenzfläche angepasst wurde. Schlecht passende Datenpunkte wurden manuell entfernt. Da die Grenzfläche wahrscheinlich nicht perfekt ellipsoidal ist, handelt es sich hierbei um eine Schätzung. ^cWerte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösung. ^dDie anisotrope Vollständigkeit wurde durch Anpassen eines Ellipsoids mithilfe kleinster Quadrate an die reziproken Gitterpunkte an der Grenzfläche, welche durch einen lokalen Mittelwert $I/\sigma(I)$ -Schwellenwert von 1,5 definiert ist, durch Zurückweisen von Ausreißern in der Anpassung aufgrund falscher Abweichungen und durch Berechnung des Anteils der beobachteten Daten, die innerhalb des so definierten Ellipsoids liegen, erreicht. Da die Grenzfläche wahrscheinlich nicht perfekt ellipsoidal ist, handelt es sich hierbei um eine Schätzung.

$$^e R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \times \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}.$$

$$^f R_{pim} = \frac{\sum_{hkl} \{1/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \times \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}.$$

$$^g CC_{1/2} = \frac{\sum (x - \langle x \rangle)(y - \langle y \rangle)}{[\sum (x - \langle x \rangle)^2 \sum (y - \langle y \rangle)^2]^{1/2}}.$$

$$^h R_{work} = \frac{(\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||)}{(\sum_{hkl} |F_{obs}|)}.$$

ⁱ R_{free} ist das gleiche wie R_{work} mit 5% zufällig ausgewählten Reflexionen, die bei der Verfeinerung weggelassen wurden. ^jB-Faktoren wurden mit Moleman2 berechnet (Kleywegt 1997). ^kDie Statistiken wurden mit MolProbity berechnet (Chen et al. 2010).

Tabelle 37: Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung der FJAT-PGA Struktur mit Phenylelessigsäure und der Struktur der FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2. Angaben in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. Alle Werte wurden wie in Tabelle 36 ermittelt. Die Datensammlung und Verfeinerung der Struktur wurde von Dr. Peer Lukat durchgeführt (HZI Braunschweig).

	FJAT-PGA mit Phenylelessigsäure	FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2
Statistiken zur Datensammlung		
Beamline	DESY PetraIII P11	DESY PetraIII P11
Wellenlänge (Å)	1,0332	1,0332
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Abmessungen der Einheitszelle		
<i>a, b, c</i> (Å)	57,47; 78,15; 212,72	102,255; 140,114; 61,260
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösungsbereich (Å)	106,36 - 1,94 (1,98 – 1,94)	82,60 - 1,93 (1,97 – 1,93)
Gesamtzahl Reflexionen	946453 (47120)	874320 (42907)
Anzahl einzigartiger Reflexionen	71495 (3517)	66601 (3284)
Durchschnittliche Multiplizität	13,2 (13,4)	13,1 (13,1)
Vollständigkeit (%)	99,8 (99,3)	100 (100)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11,0 (2,1)	16,8 (1,6)
<i>R</i> _{meas}	0,194 (1,370)	0,118 (1,750)
<i>R</i> _{pim}	0,053 (0,370)	0,032 (0,482)
CC _½	0,997 (0,774)	0,999 (0,749)
Verfeinerungsstatistiken		
Auflösung (Å)	62,98 - 1,94	57,79 - 1,93
Anzahl verwendeter Reflexionen	71486	66576
<i>R</i> _{work} (%)	15,22	20,15
<i>R</i> _{free} (%)	17,64	23,97
Anzahl Reste	1522	1351
Protein	729	724
Wasser	783	627
Ca ²⁺	2	0
Liganden	8	0
Mittlerer B-Faktor ^j (Å ²)	28,10	33,72
Protein	26,72	33,12
Wasser	37,20	39,45
Ca ²⁺	25,62	-
Liganden	51,10	-

	FJAT-PGA mit Phenyllessigsäure	FJAT-PGA-Variante A1+B1+B2
RMSD		
Bindungslänge (Å)	0,013	0,006
Bindungswinkel (°)	1,045	0,904
Ramachandran-Plot (%)		
Bevorzugte Regionen	97,10	95,83
Erlaubte Regionen	2,90	3,47
Ausreißer	0,00	0,69
MolProbity Score	1,20	1,68
PDB Code	-	-

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Dieter Jahn für die Möglichkeit meine Doktorarbeit hier im Institut anfertigen zu können und vor allem für die Unterstützung, die hilfreichen Gespräche und Diskussionen sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Bei Prof. Dr. Annett Schallmey möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats, für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken. Prof. Dr. Michael Steinert gilt mein Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Rebekka Biedendieck. Rebi, du hast mich von Anfang an unterstützt (auch schon während deiner Elternzeit) und immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Vielen Dank für dein Vertrauen, die ständige fachliche und persönliche Unterstützung, Motivation, Aufmunterung, Lob, Hilfe und deinen ständigen Einsatz. Danke auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und viele hilfreiche Anmerkungen.

Großer Dank gilt allen Kollegen aus dem BRICS und der Mibi für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, nette Mittagsgespäche und Doktorandentreffen sowie die gute Gesellschaft auf den Konferenzen. Mein ganz besonderer Dank gilt Gabi für die Einführung in das Thema, ihre immer engagierte und motivierte Art, für viele Kristalle und natürlich besonders fürs Zuhören und anregende Gespräche. Außerdem danke ich allen Brics-Mibis: Tobi, Sarah W., Simone, Annika, Christian, Jan und Sarah B. für die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen, gute Gespräche, lustige „Thirsty Tuesdays“ und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Studierenden und Praktikanten Carolin, Jan, Lena, Jannes, Elise, Lisa, Cindy, Thomas, Alicia, Chris, Michel und Bianka, die alle zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Projektpartnern Marta, Jenny, Jan, Marcel, Christoph, Anett, Carsten und Ingo für die gute Zusammenarbeit, hilfreiche Diskussionen und viel Spaß bei allen gemeinsam besuchten Veranstaltungen.

Weiterhin danke ich meinen Kooperationspartnern Dr. Peer Lukat, Dr. Jan Pippel und Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt vom HZI Braunschweig für die Lösung der Enzymstrukturen sowie Beate Jaschok-Kentner für die N-terminale Sequenzierung.

Außerdem möchte ich Mathias und Yvonne für die Hilfe bei den HPLC-Analysen, Leopold für die Einführung in die Reaktorkultivierung und Marco, Stefan und Jonas für die Hilfe mit der Äkta danken. Johnny danke ich für zahlreiche Diskussionen, Anregungen und die hilfreichen Tipps in PyMol.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie und guten Freunden für die Unterstützung bedanken! Danke vor allem an Mama, Papa, Luisa, Oma, Opa und Opa! Ohne Euch wäre diese Arbeit erst gar nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer für mich da wart und seid, mir großen Rückhalt gegeben und mich immer unterstützt habt.